

Este trabalho não seria possível sem o apoio financeiro  
da Fundação para a Ciência e a Tecnologia  
(SFRH / BD / 1071 /2000)





Universidade de Aveiro Departamento de Química  
2004

**Carla Alexandra Pina  
Cruz Nunes**

**Estudo de interacções entre componentes de  
farinha de *Sorghum bicolor* (L.) Moench**

dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Química, realizada sob a orientação científica da Doutora Ivonne Delgadillo, Professora Associada com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

## **o júri**

presidente

**Doutor Sushil Mendirata**

professor catedrático do Departamento de Física da Universidade de Aveiro

**Doutor Peter Belton**

full professor of School of Chemical Sciences and Pharmacy University of East Anglia

**Doutora Maria Luísa Duarte Martins Beirão da Costa**

professora catedrática do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa

**Doutora Ana Maria Pissara Coelho Gil**

professora associada do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

**Doutor José António Teixeira Lopes da Silva**

professor auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

**Doutora Ivonne Delgadillo Giraldo (orientadora)**

professora associada com agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

*aos meus pais*  
*ao João*



## **agradecimentos**

Agradeço à Doutora Ivonne Delgadillo o facto de ter acreditado em mim e me ter ajudado a crescer cientificamente. Mais que uma Professora é uma amiga com quem tive o prazer de trabalhar durante tantos anos (dez !!!).

À Doutora Ana Gil agradeço as sessões de RMN que gentilmente me disponibilizou e o precioso auxílio na interpretação dos espectros.

À Mestre Isabel Correia mais do que a imprescindível ajuda e a companhia constante, agradeço, principalmente, a grande amizade que permitiu que nascesse entre nós.

Agradeço ao Doutor António Barros as discussões indispensáveis para o progresso do meu trabalho e por de me ter incutido o gosto pela Quimiometria.

O meu agradecimento vai, ainda, para a minha Família e Amigos que acreditaram que eu era capaz quando nem eu acreditava, que me conseguiram aturar nos dias “não”, que sempre estiveram comigo mesmo quando eu não pude estar com eles e que, mesmo longe, se tornaram presentes nos momentos em que deles precisei.

## resumo

O presente trabalho teve como objectivo central o estudo de diversos factores indutores de alterações aquando do cozimento da farinha de sorgo e que conduzem à redução da digestibilidade proteica.

Todo o estudo foi desenvolvido tendo como termo de comparação o milho. Este cereal pertence à mesma família do sorgo e apesar de diversas similaridades não apresenta redução dos valores de digestibilidade com o cozimento.

De forma a começar o estudo de um modo global, aplicaram-se técnicas não invasivas (técnicas espectroscópicas - RMN de estado sólido e FT-IR) para analisar o efeito do cozimento nos constituintes das farinhas. Verificou-se que, para além das alterações a nível da proteína e do amido, a fracção lipídica do sorgo é profundamente afectada com o cozimento.

Em seguida foi objecto de estudo a fracção das prolaminas (kafirinas e zeínas). As fracções proteicas foram estudada por SDS-PAGE e FT-IR. A electroforese mostrou que a composição da fracção das kafirinas difere das zeínas. Sendo que, a principal diferença reside no facto das kafirinas apresentarem na sua composição um oligómero de 66 kDa que está ausente nas zeínas. Por SDS-PAGE preparativa foi estabelecida a composição dos aglomerados de elevado peso molecular e dos oligómeros das prolaminas. Após cozimento, os oligómeros tanto das zeínas como das kafirinas, sofrem alterações estruturais. Parte dessas estruturas deixa de ser sensível à redução. Por FT-IR detectou-se a presença de complexos amido-proteína na fracção de prolaminas de amostras de cereais cozidos.

Às amostras de farinhas, cruas e cozidas, foi aplicado um método de digestão *in vitro* com pepsina. Através desta metodologia verificou-se que, nas amostras cozidas, os valores de digestibilidade estão correlacionados com a presença de monómeros  $\gamma$  e  $\alpha$  e de oligómeros de 47 e 45 kDa nos resíduos que resistem à digestão.

De forma a retirar a maior informação contida nos electroforegramas, foi desenvolvido um método de análise géis de SDS-PAGE. Com esta ferramenta, a caracterização qualitativa e quantitativa dos extractos proteicos passou a ser mais precisa.

A presença de factores exógenos às proteínas foi também estudado. Para tal estudou-se o efeito de compostos fenólicos não tanínicos e de lípidos nos valores de digestibilidade proteica do sorgo. Verificou-se que, enquanto que a presença de compostos fenólicos aumenta os valores de digestibilidade proteica, a presença dos lípidos parece influenciar negativamente os referidos valores.



## abstract

The present work had, as main purpose, to study several factors that changes when sorghum flour is cooked and that can lead to the decrease on protein digestibility values.

All the study was developed using maize as comparison. This cereal belongs to the same family as sorghum, however, it didn't suffer decrease on protein digestibility upon cooking.

In order to start the study in a global way, non-invasive techniques (solid state NMR and FT-IR) were applied to study the effect of cooking in whole flour sample. Besides the expected changes on protein and starch it was found that, with cooking, strong changes occur on the lipid sorghum fraction.

Then, prolamin fraction was studied by SDS-PAGE and FT-IR. SDS-PAGE showed that kafirin and zein composition are different: kafirins have a 66 kDa oligomer that is not present in zeins. Through preparative SDS-PAGE it was established the composition of the high molecular weight aggregates and of the oligomers, of the prolamin fractions. After cooking, oligomers suffer structural changes. Part of those structures became resistant to reducing conditions. FT-IR analysis of cooked prolamin extracts verified the occurrence of starch-protein complexes.

Pepsin *in vitro* digestion was applied to un-cooked and cooked flour samples. This methodology allowed to establish a correlation between digestibility values of the cooked samples and the presence of 47 and 45 kDa oligomers and  $\gamma$  and  $\alpha$  monomers in the non-digested residues.

In order to improve the electrophoregram analysis a method was developed to analyse the SDS-PAGE images. With this tool the qualitative and quantitative analysis of protein extract became more accurate.

The influence of protein exogenous factors was also investigated. It was investigated the influence of non-tanin phenolic compounds and lipids in sorghum digestibility values. Phenolics increase protein digestibility values and lipids seems to have an opposite influence.



## PUBLICAÇÕES QUE RESULTARAM DESTE TABALHO:

- Duodu, K.G.; Nunes, A.; Delgadillo, I.; Parker, M.L.; Mills, E.N.C.; Belton, P.S. e Taylor, J.R.N. (2002) Effect of grain organisational structure and cooking on sorghum and maize protein digestibility *J. of Cereal Science*, 35, 161-174.
- Nunes, A.; Correia, I.; Barros A. e Delgadillo, I. (2004) Sequential *in vitro* pepsin digestion of uncooked and cooked sorghum and maize samples. *J. Agric. and Food Chem.*, 52, 2052-2058.
- Nunes, A.; Correia, I.; Barros A. e Delgadillo, I. Characterization of kafirin and zein oligomers by preparative SDS-PAGE. Aceite para publicação em *J. Agric. and Food Chem.* em Setembro 2004.
- Nunes A.; Nunes, C.; Barros A.; Rutledge, D. e Delgadillo I. A method for quantitative analysis of gel electrophoresis. Submetido a *Analítica Chimica Acta* em Março 2004.
- Nunes A.; Barros A.; Gil A. e Delgadillo I. Sorghum lipidic Fraction: I. Effect of cooking II. Effect on protein digestibility. Submetido a *J. of Cereal Sci.* em Maio 2004.
- Barros A., Nunes A., Costa, A. M., Rutledge, D. e Delgadillo I. Two-Dimensional Correlation Spectroscopy (2DCOS) study of starch gelatinization. Em preparação.
- Nunes, A.; Correia, I. e Delgadillo, I. (2003) Sequential *in vitro* pepsin digestion of uncooked and cooked sorghum and maize samples. Actas do 6º Encontro de Química dos Alimentos (Lisboa), Vol. II, 867-871 (ISBN 972-96065-9-5).
- Nunes, A.; Nunes, C.; Barros, A. e Delgadillo, I. (2003) Method for quantitative analysis of gel electrophoresis. Actas do 6º Encontro de Química dos Alimentos (Lisboa), Vol. II, 728-731 (ISBN 972-96065-9-5).
- Nunes, A.; Gil, A. e Delgadillo, I. (2003) Solid-state NMR study of un-cooked and cooked sorghum and maize flours. 2<sup>nd</sup> Portuguese-Brazilian NMR conference (Sintra), BM-P2.
- Nunes, A.; Correia, I e Delgadillo, I. (2003) Caracterização da fracção de prolaminas de sorgo por SDS-PAGE e SDS-PAGE preparativa: comparação com o milho, *Analítica'03* (Porto), O17.
- Duodu, K. G.; Nunes, A.; Delgadillo, I. e Belton P. S. (2003) Low protein digestibility of cooked sorghum – causes and needs for further research *in* AFRIPRO (P.S. Belton and J.R. Taylor Eds.) Pretoria, South Africa (CD).



# Índice

ÍNDICE DE FIGURAS.....	19
------------------------	----

ÍNDICE DE TABELAS.....	25
------------------------	----

<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>27</b>
------------------------	-----------

1.1 Considerações gerais sobre sorgo .....	27
--	----

1.2 Produção e formas de consumo .....	28
--	----

1.3 Estrutura do grão de sorgo .....	30
--------------------------------------	----

1.4 Comportamento da farinha de sorgo face ao cozimento .....	33
---	----

1.5 Bibliografia .....	34
------------------------	----

<b>OBJECTIVOS.....</b>	<b>37</b>
------------------------	-----------

<b>CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DAS AMOSTRAS.....</b>	<b>39</b>
---	-----------

3.1 Introdução .....	39
----------------------	----

3.1.1 Hidratos de Carbono .....	39
---------------------------------	----

3.1.2 Proteína total.....	40
---------------------------	----

3.1.3 Compostos fenólicos.....	41
--------------------------------	----

3.1.4 Lípidos.....	42
--------------------	----

3.1.5 Fibra .....	43
-------------------	----

3.1.6 Vitaminas e minerais.....	43
---------------------------------	----

3.2 Metodologia .....	44
-----------------------	----

3.2.1 Preparação das amostras .....	44
-------------------------------------	----

3.2.2 Quantificação de amido .....	45
------------------------------------	----

3.2.3 Quantificação de proteína total .....	45
---	----

3.2.4 Quantificação de lípidos.....	45
-------------------------------------	----

3.2.5 Quantificação de compostos fenólicos.....	45
---	----

3.2.6 Quantificação de humidade .....	46
---------------------------------------	----

3.2.7 Caracterização espectroscópica dos extractos de lípidos e de compostos fenólicos.....	46
--	----

3.3 Resultados e discussão .....	46
----------------------------------	----

3.3.1 Caracterização do extracto lipídico .....	47
---	----

3.3.2 Caracterização do extracto de compostos fenólicos.....	48
3.4 Bibliografia .....	49

## **CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA DAS AMOSTRAS ..... 53**

4.1 Introdução .....	53
4.2 Metodologia .....	54
4.2.1 Preparação das amostras de farinha .....	54
4.2.2 Ensaaios de FT-IR .....	55
4.2.3 Ensaaios de RMN <sup>13</sup> C .....	55
4.2.4 Análise quimiométrica .....	56
4.3 Resultados e discussão .....	56
4.3.1 Análise directa de espectros de FT-IR.....	56
4.3.1.1 Amostras cruas .....	56
4.3.1.2 Amostras cozidas.....	58
4.3.2 Análise dos espectros de FT-IR por PCA .....	61
4.3.2.1 Amostras cruas .....	61
4.3.2.2 Amostras cozidas.....	63
4.3.3 Estudo espectroscópico do efeito do cozimento em farinhas .....	64
4.3.4 Análise directa de espectros de RMN <sup>13</sup> C.....	66
4.3.4.1 Amostras cruas .....	66
4.3.4.2 Amostras cozidas.....	70
4.3.5 Análise dos espectros de RMN <sup>13</sup> C por PCA .....	73
4.3.6 Análise dos espectros de FT-IR@RMN <sup>13</sup> C.....	78
4.3.6.1 FT-IR@CP-MAS <sup>13</sup> C .....	78
4.3.6.2 FT-IR@SPE <sup>13</sup> C .....	80
4.4 Conclusões .....	83
4.5 Bibliografia .....	85

## **ANÁLISE DE GÉIS DE SDS-PAGE ..... 87**

5.1 Introdução .....	87
5.2 Metodologia .....	89
5.2.1 SDS-PAGE.....	89
5.2.2 Preparação das amostras .....	90
5.2.2.1 Análise qualitativa .....	90
5.2.2.2 Análise quantitativa .....	90
5.2.3 Tratamento aplicado aos géis .....	91

5.3 Resultados e discussão .....	93
5.3.1 Análise qualitativa .....	93
5.3.1.1 Caso prático .....	96
5.3.2 Análise quantitativa .....	97
5.3.2.1 Validação interna .....	100
5.3.2.2 Validação externa .....	101
5.4 Conclusões .....	102
5.5 Bibliografia .....	103

## **CARACTERIZAÇÃO DE ZEÍNAS E KAFIRINAS ..... 105**

6.1 Introdução .....	105
6.2 Metodologia .....	109
6.2.1 Extracção das prolaminas com t-butanol .....	110
6.2.2 Extracção com solução extractora de Wallace .....	111
6.2.3 SDS-PAGE .....	111
6.2.4 Obtenção do perfil electroforético .....	112
6.2.5 SDS-PAGE preparativa .....	113
6.2.6 Ensaio de FT-IR .....	114
6.3 Resultados e discussão .....	114
6.3.1 Análise qualitativa e quantitativa dos extractos de prolaminas .....	114
6.3.1.1 Estudo da hidrofobicidade das prolaminas .....	114
6.3.1.2 Extractos obtidos com t-butanol .....	117
6.3.1.3 Extractos obtidos com solução de Wallace .....	125
6.3.2 Estudo dos extractos por FT-IR .....	127
6.3.2.1 Extracção com t-butanol .....	127
6.3.2.2 Extracção com solução de Wallace .....	131
6.3.3 Estudo dos polímeros proteicos por SDS-PAGE preparativa .....	134
6.3.3.1 Amostras cruas .....	134
6.3.3.2 Amostras cozidas .....	137
6.4 Conclusões .....	139
6.4 Bibliografia .....	140

## **DIGESTIBILIDADE PROTEICA *IN VITRO* ..... 145**

7.1 Introdução .....	145
7.2 Metodologia .....	147
7.2.1 Preparação das amostras .....	147

7.2.2 Ensaio de digestibilidade .....	147
7.2.3 Determinação de proteína para cálculo da digestibilidade .....	149
7.2.4 Cálculo dos valores de digestibilidade .....	149
7.2.5 Ensaio de FT-IR .....	149
7.3 Resultados e discussão .....	150
7.3.1 Digestibilidade proteica de farinha crua e cozida.....	150
7.3.2 Visualização dos resíduos digeridos por SEM.....	152
7.3.3 Análise dos resíduos digeridos por FT-IR.....	154
7.3.4 Acompanhamento da digestão sequencial por FT-IR.....	158
7.4 Conclusões .....	162
7.5 Bibliografia .....	163

## **CALIBRAÇÃO DO FT-IR PARA DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA..... 167**

8.1 Introdução .....	167
8.2 Metodologia .....	168
8.2.1 Preparação das amostras .....	168
8.2.2 Obtenção de espectros de FT-IR.....	169
8.3 Resultados e discussão .....	169
8.4 Conclusões .....	172
8.5 Bibliografia .....	172

## **DIGESTIBILIDADE SEQUENCIAL *IN VITRO*..... 175**

9.1. Introdução .....	175
9.1.1 Inter-cruzamento entre proteínas via S-S .....	175
9.1.2 Outro tipo de inter-cruzamento entre proteínas .....	177
9.1.3 Estrutura do corpo proteico.....	177
9.2. Metodologia .....	179
9.2.1 Preparação das amostras .....	179
9.2.2 Digestibilidade sequencial.....	179
9.2.3 Análise dos extractos proteicos por SDS-PAGE.....	181
9.2.4 Determinação de proteína para cálculo da digestibilidade .....	182
9.2.5 Cálculo dos valores de digestibilidade .....	182
9.2.6 Ensaio de FT-IR .....	182
9.3 Resultados e discussão .....	183
9.3.1 Determinação da eficiência do método de extracção .....	183
9.3.2 Digestão sequencial - extracção de Wallace .....	186



9.3.2.1 Amostras de farinha crua .....	186
9.3.2.2 Amostras de farinha cozida.....	189
9.3.3 Indicadores da digestibilidade .....	193
9.3.4 Digestão sequencial - extracção com t-butanol .....	195
9.3.4.1 Amostras de farinha crua .....	195
9.4 Conclusões .....	199
9.5 Bibliografia .....	200

## **EFEITO DE COMPOSTOS FENÓLICOS E LÍPIDOS NA DIGESTÃO .....203**

10.1 Introdução .....	203
10.1.1 Efeito dos compostos fenólicos na digestão .....	204
10.1.2 Efeito dos lípidos na digestão .....	205
10.2 Metodologia.....	206
10.2.1 Preparação das amostras .....	207
10.2.2 Estudo da eficiência de extracção .....	207
10.2.3 Digestão sequencial.....	208
10.2.4 Análise dos extractos proteicos por SDS-PAGE.....	209
10.2.5 Determinação valores digestibilidade .....	210
10.2.6 Cálculo dos valores de digestibilidade .....	210
10.3 Resultados e discussão .....	210
10.3.1 Efeito dos compostos fenólicos.....	210
10.3.1.1 Eficiência de extracção dos compostos fenólicos .....	210
10.3.1.2 Efeito dos compostos fenólicos nos valores de digestibilidade...	212
10.3.1.3 Efeito dos compostos fenólicos na digestibilidade sequencial....	214
10.3.3 Efeito dos lípidos.....	218
10.3.3.1 Eficiência da remoção de lípidos .....	218
10.3.3.2 Efeito dos lípidos nos valores de digestibilidade.....	220
10.3.3.3 Efeito dos lípidos na digestibilidade sequencial .....	222
10. 4 Conclusões .....	225
10. 5 Bibliografia .....	226

## **ESTUDO DA GELATINIZAÇÃO DO AMIDO POR 2D-COS .....229**

11.1 Introdução .....	229
11.2 Metodologia.....	231
11.2.1 Preparação das amostras .....	231
11.2.2 Análise por FT-IR .....	231

11.2.3 Análise por FT-IR .....	232
11.3 Resultados e discussão .....	232
11.4 Conclusões .....	243
11.5 Bibliografia .....	243
<b>CONCLUSÕES FINAIS .....</b>	<b>245</b>

# Índice de figuras

<b>Figura 1.1:</b> Representação esquemática de um grão de sorgo. ....	30
<b>Figura 3.1:</b> Espectros de FT-IR dos extractos de clorofórmio. ....	48
<b>Figura 3.2:</b> Espectros de FT-IR dos extractos de metanol ácido. ....	48
<b>Figura 4.1:</b> Espectros de FT-IR de amostras de farinha de milho e sorgo cruas. <b>(A)</b> Expansão correspondente à região espectral das proteínas (1800-1450 $\text{cm}^{-1}$ ) e <b>(B)</b> expansão da região espectral correspondente à região do amido (1200-800 $\text{cm}^{-1}$ ). ....	57
<b>Figura 4.2:</b> Espectros de FT-IR de amostras de farinha de milho e sorgo cozidas. <b>(A)</b> Expansão correspondente à região espectral das proteínas (1800-1450 $\text{cm}^{-1}$ ) e <b>(B)</b> expansão da região espectral correspondente à região do amido (1200-800 $\text{cm}^{-1}$ ). ....	59
<b>Figura 4.3:</b> <b>(A)</b> Diagrama de coordenadas factoriais de PC1 vs PC2 e <b>(B)</b> diagrama das contribuições factoriais do PC1 e PC2 referentes aos espectros de FT-IR de amostras de farinha crua. Espectros analisados na sub-região 1834-505 $\text{cm}^{-1}$ . ....	61
<b>Figura 4.4:</b> <b>(A)</b> Diagrama de coordenadas factoriais de PC2 vs PC3 e <b>(B)</b> diagrama das contribuições factoriais do PC2 e PC3 referentes aos espectros de FT-IR de amostras de farinha crua. Espectros analisados na sub-região 1834-505 $\text{cm}^{-1}$ . ....	62
<b>Figura 4.5:</b> <b>(A)</b> Diagrama de coordenadas factoriais de PC2 vs PC5 e <b>(B)</b> diagrama das contribuições factoriais do PC2 e PC5 referentes aos espectros de FT-IR de amostras de farinha cozidas. Espectros analisados na sub-região 1834-505 $\text{cm}^{-1}$ . ....	64
<b>Figura 4.6:</b> <b>(A)</b> Diagrama de coordenadas factoriais de PC1 vs PC2 e <b>(B)</b> diagrama das contribuições factoriais do PC1 referentes aos espectros de FT-IR de amostras de farinha crua e cozida. Espectros analisados na sub-região 1834-505 $\text{cm}^{-1}$ . ....	65
<b>Figura 4.7:</b> Espectro de CP-MAS $^{13}\text{C}$ <b>(A)</b> e de SPE $^{13}\text{C}$ <b>(B)</b> das amostras de farinha de sorgo crua. ....	67
<b>Figura 4.8:</b> Espectro de CP-MAS $^{13}\text{C}$ <b>(A)</b> e de SPE $^{13}\text{C}$ <b>(B)</b> da amostra de farinha de milho crua. ....	68
<b>Figura 4.9:</b> Espectro de CP-MAS $^{13}\text{C}$ <b>(A)</b> e de SPE $^{13}\text{C}$ <b>(B)</b> de farinha de milho cozida. ....	71
<b>Figura 4.10:</b> Espectro de CP-MAS $^{13}\text{C}$ <b>(A)</b> e de SPE $^{13}\text{C}$ <b>(B)</b> das farinhas de sorgo cozidas. ....	72
<b>Figura 4.11:</b> <b>(A)</b> Diagrama de coordenadas factoriais de PC1 vs PC4 e <b>(B)</b> diagrama das contribuições factoriais do PC1 e PC4 referentes aos espectros de RMN $^{13}\text{C}$ das amostras de farinha crua e cozida de todas as variedades de farinha. Espectros analisados na sub-região 0-200 ppm. ....	74
<b>Figura 4.12:</b> <b>(A)</b> Diagrama de coordenadas factoriais de PC1 vs PC2 e <b>(B)</b> diagrama das contribuições factoriais do PC1 e PC2 referentes aos espectros de RMN CP-MAS $^{13}\text{C}$ das amostras de farinha crua e cozida de todas as variedades de farinha. Espectros analisados na sub-região 0-200 ppm. ....	75
<b>Figura 4.13:</b> <b>(A)</b> Diagrama de coordenadas factoriais de PC2 vs PC3 e <b>(B)</b> diagrama das contribuições factoriais do PC2 e PC3 referentes aos espectros de RMN CP-MAS $^{13}\text{C}$ das amostras de farinha crua e cozida de todas as variedades de farinha. Espectros analisados na sub-região 160-190 ppm e 40-10 ppm. ....	76
<b>Figura 4.14:</b> <b>(A)</b> Diagrama de coordenadas factoriais de PC1 vs PC2 e <b>(B)</b> diagrama das contribuições factoriais do PC1 e PC2 referentes aos espectros de RMN SPE $^{13}\text{C}$ das	

amostras de farinha crua e cozida de todas as variedades de farinha. Espectros analisados na sub-região 200-0 ppm. ....	77
<b>Figura 4.15:</b> Diagrama de coordenadas factoriais de PC1 vs PC2 referente à combinação dos domínios de FT-IR e CP-MAS <sup>13</sup> C. Amostras de farinha crua e cozida de todas as variedades de farinha. ....	79
<b>Figura 4.16:</b> Superfície de contribuições factoriais do PC1 referentes à combinação dos domínios de FT-IR e CP-MAS <sup>13</sup> C. Amostras de farinha crua e cozida de todas as variedades de farinha. ....	79
<b>Figura 4.17:</b> Diagrama de coordenadas factoriais de PC1 vs PC2 referente à combinação dos domínios de FT-IR e SPE <sup>13</sup> C. Amostras de farinha crua e cozida de todas as variedades de farinha. ....	81
<b>Figura 4.18:</b> Superfície de contribuições factoriais do PC1 <b>(A)</b> e PC2 <b>(B)</b> referentes à combinação dos domínios de FT-IR e SPE <sup>13</sup> C. Amostras de farinha crua e cozida de todas as variedades de farinha. ....	82
<b>Figura 5.1:</b> Resumo do tratamento a que cada uma dos trilhos é submetido. <b>A</b> – electroforegrama, <b>B</b> – imagem de código colorido, <b>C</b> – perfil electroforético obtido a partir da imagem código, <b>D</b> – matriz diferença, <b>E</b> – matriz independência, <b>F</b> – perfil electroforético obtido a partir da matriz independência, <b>1</b> – conversão de cores, <b>2</b> – tratamento matemático baseado teoria de probabilidades condicionais. ....	93
<b>Figura 5.2:</b> Análise correspondente ao electroforegrama que apresenta bandas bem definidas. <b>A</b> – electroforegrama; <b>B</b> – imagem de código colorido; <b>C</b> – matriz independência e <b>D</b> - matriz diferença. ....	94
<b>Figura 5.3:</b> Comparação entre o perfil electroforético obtido a partir de imagem colorida <b>(B)</b> e o perfil electroforético obtido a partir da matriz independência <b>(D)</b> . ....	94
<b>Figura 5.4:</b> Análise correspondente ao electroforegrama que apresenta bandas irregulares. <b>A</b> – imagem sem tratamento; <b>B</b> – imagem colorida; <b>C</b> – matriz independência e <b>D</b> - matriz diferença. ....	95
<b>Figura 5.5:</b> Comparação entre o perfil electroforético obtido a partir de imagem colorida <b>(A)</b> e o perfil electroforético obtido a partir da matriz independência <b>(B)</b> . ....	95
<b>Figura 5.6:</b> Trilho electroforético correspondente a marcadores moleculares <b>(A)</b> e a uma amostra real <b>(C)</b> e os perfis electroforéticos correspondentes <b>(B e D)</b> . ....	96
<b>Figura 5.7:</b> Correlação entre pesos moleculares dos Marcadores Moleculares e logaritmo da mobilidade proteica ( $y = -0,0084 * x + 2,45$ e $R^2 0,96$ ). ....	97
<b>Figura 5.8:</b> Electroforegramas utilizados para calibração - total de 20 diferentes concentrações da mesma amostra (Gel 1 e Gel 2). ....	98
<b>Figura 5.9:</b> Comparação entre os perfis electroforéticos antes e após aplicação do tratamento matemático ( $\Leftarrow$ região correspondente à banda electroforética). ....	98
<b>Figura 5.10:</b> Correlação entre a concentração de proteína ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) e área das bandas electroforéticas. Estas correlações resultam separadamente do Gel 1 e Gel 2. ....	99
<b>Figura 5.11:</b> Correlação entre a concentração de proteína ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) e as áreas dos perfis electroforéticos. Esta correlação resulta da combinação dos valores do Gel 1 e do Gel 2. ....	100
<b>Figura 5.12:</b> Concentrações reais vs. concentrações previstas, referentes às amostras do Gel 1; foi utilizada a correlação estabelecida para o Gel 2 ( $y = 1,1107 * x + 0,4924$ ). ..	101
<b>Figura 5.13:</b> Electroforegrama usado para a validação externa (Gel 3), com as concentrações reais e as concentrações previstas. ....	101
<b>Figura 5.14:</b> Concentrações reais vs. concentrações previstas das amostras do Gel 3; foi utilizada nos cálculos a correlação estabelecida para Gel 1 + Gel 2 ( $y = 1.1692 * x + 0.5714$ ). ....	102
<b>Figura 6.1:</b> Fluxograma referente ao processo de caracterização de prolaminas. ....	110

<b>Figura 6.2:</b> Extracção com gradiente de t-butanol (de 10 a 100%) a farinha de sorgo da variedade NK283. ....	115
<b>Figura 6.3:</b> Extracção com gradiente de t-butanol (de 10 a 100%) a farinha de milho. ....	116
<b>Figura 6.4:</b> Electroforegramas de prolaminas extraídas de farinha crua com t-butanol. Os perfis electroforéticos são apresentados junto de cada electroforegrama. ....	117
<b>Figura 6.5:</b> Electroforegramas de prolaminas extraídas de farinha crua, com t-butanol, após redução. Os perfis electroforéticos são apresentados junto de cada electroforegrama. ....	119
<b>Figura 6.6:</b> Electroforegramas de prolaminas extraídas de farinha cozida com t-butanol (1 hora de extracção). Os perfis electroforéticos são apresentados junto de cada electroforegrama. ....	121
<b>Figura 6.7:</b> Electroforegramas de prolaminas extraídas de farinha cozida, com t-butanol, durante 1 hora, após redução. Os perfis electroforéticos são apresentados junto de cada electroforegrama. ....	122
<b>Figura 6.8:</b> Electroforegramas de prolaminas extraídas de farinha cozida, com t-butanol, durante 24 horas. Os perfis electroforéticos são apresentados junto de cada electroforegrama. ....	123
<b>Figura 6.9:</b> Electroforegramas de prolaminas extraídas de farinha cozida, com t-butanol, durante 24 horas e em condições redutoras. Os perfis electroforéticos são apresentados junto de cada electroforegrama. ....	124
<b>Figura 6.10:</b> Electroforegramas de prolaminas extraídas de farinha cozida, com solução de Wallace, durante 1 hora após extracção com t-butanol 60%. Os perfis electroforéticos são apresentados junto de cada electroforegrama. ....	125
<b>Figura 6.11:</b> Electroforegramas de prolaminas extraídas de farinha crua, com solução de Wallace. Os perfis electroforéticos são apresentados junto de cada electroforegrama. ....	126
<b>Figura 6.12:</b> Electroforegramas de prolaminas extraídas de farinha cozida, com solução de Wallace. Os perfis electroforéticos são apresentados junto de cada electroforegrama. ....	126
<b>Figura 6.13:</b> Espectros de FT-IR dos extractos de prolaminas obtidos por extracção com solução de t-butanol 60% a partir de farinha crua ( <b>A</b> ) e a partir de farinha cozida ( <b>B</b> ). ....	128
<b>Figura 6.14:</b> Espectros de FT-IR dos resíduos amiláceos depois da extracção com t-butanol 60% a partir de farinha crua ( <b>A</b> ) e a partir de farinha cozida ( <b>B</b> ). ....	130
<b>Figura 6.15:</b> Espectros de FT-IR dos extractos de prolaminas obtidos por extracção com solução de Wallace a partir de farinha crua ( <b>A</b> ) e a partir de farinha cozida ( <b>B</b> ). ....	132
<b>Figura 6.16:</b> Espectros de FT-IR dos resíduos resultantes após extracção com solução de Wallace a partir de farinha crua ( <b>A</b> ) e a partir de farinha cozida ( <b>B</b> ). ....	133
<b>Figura 6.17:</b> Composição das bandas electroforéticas das fracções de prolaminas extraídas de farinha crua analisadas por electroforese preparativa. ....	136
<b>Figura 6.18:</b> Composição das bandas electroforéticas das fracções de prolaminas extraídas de farinha cozida, analisadas por electroforese preparativa. ....	138
<b>Figura 7.1:</b> Fluxograma referente ao procedimento da determinação da digestão proteica <i>in vitro</i> . ....	148
<b>Figura 7.2:</b> Percentagem da digestibilidade de amostras de farinha de milho e sorgo cruas e cozidas. Valores determinados a partir do teor em azoto em amostras digeridas e em amostras não digeridas. ....	151
<b>Figura 7.3:</b> Micrografias referentes aos resíduos resultantes da digestão da farinha de milho crua após 0 ( <b>A1</b> e <b>A2</b> ) e 120 ( <b>B1</b> e <b>B2</b> ) minutos de digestão. ....	152
<b>Figura 7.4:</b> Micrografias referentes aos resíduos resultantes da digestão da farinha de sorgo (KLW) crua após 0 ( <b>A1</b> e <b>A2</b> ) e 120 ( <b>B1</b> e <b>B2</b> ) minutos de digestão. ....	153

<b>Figura 7.5:</b> (A) Diagrama de coordenadas factoriais de PC1 vs PC2 e (B) diagrama das contribuições factoriais do PC1 e PC2 referentes aos resíduos crus e cozidos não digeridos (t0) e digeridos durante 120 minutos (t120). .....	154
<b>Figura 7.6:</b> (A) Diagrama de coordenadas factoriais de PC1 vs PC2 e (B) diagrama das contribuições factoriais do PC1 referentes aos resíduos crus não digeridos (t0) e digeridos durante 120 minutos (t120). .....	156
<b>Figura 7.7:</b> (A) Diagrama de coordenadas factoriais de PC1 vs PC2 e (B) diagrama das contribuições factoriais do PC1 e PC2 referentes aos resíduos cozidos não digeridos (t0) e digeridos durante 120 minutos (t120). (C) Diagrama de coordenadas factoriais de PC1 vs PC2 apresentando as cinco variedades de farinha diferenciadas. ....	157
<b>Figura 7.8:</b> (A) Diagrama de coordenadas factoriais e (B) diagrama das contribuições factoriais referentes ao acompanhamento sequencial da digestão por FT-IR de amostras cruas com 0, 30 e 120 minutos de digestão. ....	159
<b>Figura 7.9:</b> (A) Diagrama de coordenadas factoriais e (B) diagrama das contribuições factoriais referentes ao acompanhamento sequencial da digestão por FT-IR de amostras cozidas com 0, 30 e 120 minutos de digestão. ....	161
<b>Figura 8.1:</b> Fluxograma referente ao procedimento de digestão sequencial <i>in vitro</i> para obtenção de proteínas com diferentes concentrações de proteína (adaptado de Weaver <i>et al.</i> 1998 e Aboubacar <i>et al.</i> 2001). ....	168
<b>Figura 8.2:</b> Representação gráfica do ruído associado ao método de previsão em função do número de factores COS e do número de variáveis latentes. ....	170
<b>Figura 8.3:</b> Vector <b>b</b> do modelo de previsão obtido com uma variável latente. ....	170
<b>Figura 8.4:</b> Comparação entre os valores de proteína previstos pelo modelo e os valores determinados por Análise Elemental. Amostras utilizadas para construção do modelo de previsão. ....	171
<b>Figura 8.5:</b> Comparação entre os valores de proteína previstos pelo modelo e os valores determinados por Análise Elemental. Amostras utilizadas para validação externa. ....	171
<b>Figura 9.1:</b> Imagem de TEM de corpos proteicos de sorgo no endosperma amiláceo (Shull <i>et al.</i> 1992). .....	177
<b>Figura 9.2:</b> Fluxograma referente ao procedimento da digestão sequencial <i>in vitro</i> e extracção das proteínas não digeridas. ....	180
<b>Figura 9.3:</b> (A) Diagrama de coordenadas factoriais de PC1 vs PC2 e (B) diagrama das contribuições factoriais do PC1 referentes aos resíduos crus e cozidos não digeridos (t0) e digeridos durante 120 minutos (t120) após extracção com solução extractora de proteínas (solução de Wallace). .....	184
<b>Figura 9.4:</b> (A) Diagrama de coordenadas factoriais de PC1 vs PC2 e (B) diagrama das contribuições factoriais do PC1 e PC2 referentes aos resíduos crus e cozidos não digeridos (t0) e digeridos durante 120 minutos (t120) após extracção com 60% t-butanol. ....	185
<b>Figura 9.5 :</b> Electroforegramas correspondentes à digestão sequencial de farinha de milho e de sorgo cruas. Junto aos trilhos electroforéticos das amostras com 0 e 120 minutos são apresentados os respectivos perfis electroforéticos (p0 e p120, respectivamente). ....	187
<b>Figura 9.6 :</b> Variação das áreas das bandas electroforéticas ao longo do tempo de digestão; resultados referentes a farinha crua. ....	188
<b>Figura 9.7 :</b> Electroforegramas correspondentes à digestão sequencial de farinha de milho e de sorgo cozida. Junto aos trilhos electroforéticos das amostras com 0 e 120 minutos são apresentados os respectivos perfis electroforéticos (p0 e p120, respectivamente). ....	190
<b>Figura 9.8 :</b> Variação das áreas das bandas electroforéticas ao longo do tempo de digestão; resultados referentes a farinha cozida. ....	192

<b>Figura 9.9:</b> Áreas electroforéticas correspondentes <b>(A)</b> aos oligómeros de 45 e 47 kDa e <b>(B)</b> às prolaminas $\gamma$ e $\alpha$ presentes nos trilhos electroforéticos das amostras com 0 e 120 minutos de digestão. ....	194
<b>Figura 9.10:</b> Electroforegramas correspondentes à digestão sequencial de farinha de milho e de sorgo cruas (extracção com t-butanol). Junto aos trilhos electroforéticos das amostras com 0 e 120 minutos são apresentados os respectivos perfis electroforéticos (p0 e p120, respectivamente).....	196
<b>Figura 9.11:</b> Electroforegramas correspondentes à digestão sequencial de farinha de milho e de sorgo cruas (amostras extraídas com t-butanol e reduzidas). Junto aos trilhos electroforéticos das amostras com 0 e 120 minutos são apresentados os respectivos perfis electroforéticos (p0 e p120, respectivamente). ....	198
<b>Figura 10.1:</b> Fluxograma do procedimento referente à digestão sequencial <i>in vitro</i> e extracção das proteínas não digeridas. ....	208
<b>Figura 10.2:</b> <b>(A)</b> Diagrama de coordenadas factoriais de PC1 vs PC2 e <b>(B)</b> diagrama das contribuições factoriais do PC1 referentes aos espectros de FT-IR das amostras de farinha antes e após a extracção com metanol ácido. Espectros analisados na sub-região 1800-550 $\text{cm}^{-1}$ .....	211
<b>Figura 10.3:</b> Percentagem da digestibilidade de amostras de farinha de milho e sorgo às quais foram removidos os compostos fenólicos e após serem submetidas a cozimento. Valores determinados a partir do teor em azoto em amostras digeridas (t120) e em amostras não digeridas (t0).....	212
<b>Figura 10.4:</b> Electroforegramas correspondentes à digestão sequencial de farinha de milho e de sorgo cruas, após remoção de compostos fenólicos. Junto aos trilhos electroforéticos das amostras com 0 e 120 minutos são apresentados os respectivos perfis electroforéticos (p0 e p120, respectivamente). ....	215
<b>Figura 10.5:</b> Electroforegramas correspondentes à digestão sequencial de farinha de milho e de sorgo cozidas após remoção de compostos fenólicos. Junto aos trilhos electroforéticos das amostras com 0 e 120 minutos são apresentados os respectivos perfis electroforéticos (p0 e p120, respectivamente). ....	217
<b>Figura 10.6:</b> <b>(A)</b> Diagrama de coordenadas factoriais de PC1 vs PC2 e <b>(B)</b> diagrama das contribuições factoriais do PC2 referentes aos espectros de FT-IR das amostras de farinha ante e após a extracção com clorofórmio. Espectros analisados na sub-região 1800-550 $\text{cm}^{-1}$ .....	218
<b>Figura 10.7:</b> Espectros de SPE $^{13}\text{C}$ das amostras de farinha de milho e de sorgo NK 283 antes <b>(A)</b> e após <b>(B)</b> extracção com clorofórmio.....	219
<b>Figura 10.8:</b> Percentagem da digestibilidade de amostras de farinha de milho e sorgo às quais foram removidos os lípidos e após serem submetidas a cozimento. Valores determinados a partir do teor em azoto em amostras digeridas e em amostras não digeridas. ....	220
<b>Figura 10.9:</b> Electroforegramas correspondentes à digestão sequencial de farinha de milho e de sorgo cruas, após remoção de lípidos. Junto aos trilhos electroforéticos das amostras com 0 e 120 minutos são apresentados os respectivos perfis electroforéticos (p0 e p120, respectivamente). ....	223
<b>Figura 10.10:</b> Electroforegramas correspondentes à digestão sequencial de farinha de milho e de sorgo cozidas após remoção de lípidos. Junto aos trilhos electroforéticos das amostras com 0 e 120 minutos são apresentados os respectivos perfis electroforéticos (p0 e p120, respectivamente).....	224
<b>Figura 11.1:</b> Espectro de FT-IR típico do amido de milho purificado na presença de excesso de água e à temperatura de 30°C. ....	233
<b>Figura 11.2:</b> Espectros de FT-IR do amido de milho purificado na presença de excesso de água após ter sido aquecido a 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 95°C.....	234

<b>Figura 11.3:</b> Espectros de FT-IR do milho (A) e de sorgo (B) na presença de excesso de água e à temperatura de 30°C. ....	235
<b>Figura 11.4:</b> Espectros de FT-IR do milho (A) e de sorgo (B) na presença de excesso de água e após aquecimento a 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 95°C.....	235
<b>Figura 11.5:</b> Mapas síncronos de amido de milho (A), farinha de milho (B) e farinha de sorgo (C) em função da temperatura. ....	237
<b>Figura 11.6:</b> Mapas assíncronos de amido de milho purificado (A), farinha de milho (B) e farinha de sorgo (C) em função da temperatura. ....	240



# Índice de tabelas

<b>Tabela 3.1:</b> Composição dos nutrientes do sorgo e outros cereais em 100 g de porção comestível e 12% de humidade (Hulse <i>et al.</i> 1980).....	39
<b>Tabela 3.2:</b> Resultados da análises químicas a que foram submetidas as variedades de farinha estudadas. ....	47
<b>Tabela 4.1:</b> Alterações ocorridas nos sinais correspondentes às Amidas I e II com o cozimento (número de onda em cm <sup>-1</sup> ).....	60
<b>Tabela 4.2:</b> Atribuições dos sinais dos espectros de CP-MAS <sup>13</sup> C e SPE <sup>13</sup> C (valores em ppm).....	69
<b>Tabela 4.3:</b> Atribuições das correlações FT-IR Θ CP-MAS <sup>13</sup> C apresentadas nas superfícies de correlação PC1 e PC2 referentes às amostras de farinhas cruas e cozidas.....	80
<b>Tabela 4.4:</b> Atribuições das correlações FT-IR Θ SPE <sup>13</sup> C apresentadas nas superfícies de correlação PC1 e PC2 referentes às amostras de farinhas cruas e cozidas.....	83
<b>Tabela 5.1:</b> Caracterização das amostras usadas para electroforese – correspondência entre o volume de amostra aplicado em cada poço electroforético e a concentração de proteína.....	91
<b>Tabela 5.2:</b> Caracterização das amostras usadas na validação - correspondência entre o volume de amostra aplicado em cada poço electroforético e a concentração de proteína. ....	91
<b>Tabela 6.1:</b> Composição quantitativa das prolaminas de milho e de sorgo. ....	118
<b>Tabela 6.2:</b> Composição qualitativa das prolaminas de milho e sorgo, após redução. ....	120
<b>Tabela 6.3:</b> Composição dos oligómeros dos extractos de prolaminas de amostras de farinha cruas. ....	135
<b>Tabela 6.4:</b> Composição dos oligómeros dos extractos de prolaminas de amostras de farinha cozidas.....	137
<b>Tabela 7.1:</b> Percentagem da digestibilidade de amostras de farinha de milho e sorgo cruas e cozidas. Redução dos valores de digestibilidade com o cozimento. ....	151
<b>Tabela 10.1:</b> Percentagem da digestibilidade de amostras de farinha de milho e sorgo cruas e sem compostos fenólicos. Redução dos valores de digestibilidade com a remoção de compostos fenólicos. ....	213
<b>Tabela 10.2:</b> Percentagem da digestibilidade de amostras de farinha de milho e sorgo cozidas com e sem compostos fenólicos. Redução dos valores de digestibilidade ocasionadas pela remoção de compostos fenólicos.....	214
<b>Tabela 10.3:</b> Percentagem da digestibilidade de amostras de farinha de milho e sorgo cruas e sem lípidos. Redução dos valores de digestibilidade com a remoção de lípidos.....	221
<b>Tabela 10.4:</b> Percentagem da digestibilidade de amostras de farinha de milho e sorgo cozidas com e sem lípidos. Variação dos valores de digestibilidade ocasionadas pela remoção de lípidos. ....	222
<b>Tabela 11.1:</b> Correlações entre sinais assíncronos observados nos mapas correspondentes..	241



## Introdução

### 1.1 Considerações gerais sobre sorgo

O sorgo é um cereal tropical do tipo C4 que pertence à família das *Poaceae*, tal como o milho e o arroz. À semelhança do milho, é diploide com  $2n=20$  cromossomas, no entanto o seu genoma é um terço inferior (Rosenow *et al.* 1997).

Este cereal pertence ao género *Sorghum* e a espécie mais relevante, em termos de cultivo, é a *bicolor* L. Moench. Esta espécie pode ser subdividida em catorze tipos (cinco raças e nove raças intermédias) que podem ser cultiváveis ou selvagens.

Pensa-se que o sorgo terá surgido na Etiópia há 3-5 mil anos, não se sabendo precisar o século exacto (Harlan, 1971). Pensa-se que daqui foi para a África Austral, transportado por um povo que utilizava o grão de sorgo para produção de cerveja. O sorgo foi levado da África à Índia, provavelmente, durante o primeiro milénio a.C.. Há provas da sua existência, na Índia, no ano 1000 a.C.. Foi, talvez transportado em barcos, da África para a Índia durante cerca de três mil anos. A sua difusão para a China e sudoeste asiático ocorreu por volta do início da era cristã, ou talvez mais cedo, através da rota do comércio das sedas.

Em meados do século XIX chegou à América uma variedade de sorgo: “milho da Guiné”. Esta variedade, proveniente da África Ocidental era transportada nos barcos dos comerciantes de escravos. No entanto, aí, o seu cultivo não teve importância até ao século XX (FAO, 1995).

A sua vantagem, comparativamente aos restantes cereais, reside no facto de tolerar ambientes onde nenhum outro cereal cresceria. As razões de tal tolerância ainda não são conhecidas mas sem duvida serão múltiplas.

Apresenta raízes extensas (National Research Council, 1996), conserva a humidade reduzindo a transpiração, enrolando as folhas, que possuem ainda quantidades invulgarmente elevadas de cera epicuticular (Serena-Saldivar *et al.* 1995). Há estudos que sugerem que em condições de falta de água o sorgo possui uma elevada capacidade de ajustar a pressão osmótica; acumula açúcares e amino-ácidos nas células de forma a reter a água (Doggett, 1988).

Estudos realizados no Zimbabwe e no Quênia, desenvolvidos em condições controladas, mostraram que, na ausência de condições mínimas para o desenvolvimento de plantas, o sorgo desenvolve-se preferencialmente ao milho (Serena-Saldivar *et al.* 1995).

Uma característica marcante do sorgo é a sua capacidade de sintetizar taninos condensados conhecidos por proantocianidinas. Do ponto de vista do consumo pode estabelecer-se uma classificação em termos do teor em taninos. Desta forma, o sorgo pode ser dividido em duas classes principais: sorgo com elevado teor em taninos (sorgo castanho ou resistente a aves) e sorgo sem taninos condensados (sorgo doce). Este último apesar de não possuir taninos possui, tal como os restantes cereais, outros compostos fenólicos (Doggett, 1988).

## 1.2 Produção e formas de consumo

No anos 90 a produção anual de sorgo era de 61 milhões de toneladas, esta produção coloca o sorgo entre os cinco primeiros cereais mais produzidos, depois do trigo, arroz, milho e cevada. Mesmo assim o sorgo contribui, apenas, para 5% da produção mundial de cereais. Em 1988 as regiões do globo que mais produziam sorgo foram a África (20,09%) e a Ásia (13,48%), mas foram os Estados Unidos (13,21%) o país com maior produção (FAO, 1995).

O sorgo é empregue tanto para alimentação humana como para alimentação animal. Até ao início da década de sessenta, uma enorme fracção do sorgo era produzido para alimentação humana. Desde então, essa

aplicação tem vindo a diminuir progressivamente. Simultaneamente, a utilização de sorgo para alimentação animal duplicou, passando de 30%, nos anos sessenta, para 60% em 1988 (FAO, 1995).

Na maioria dos casos o sorgo é consumido localmente, os consumidores de dietas à base de sorgo habitam zonas rurais pobres, nas quais a maioria da população é subnutrida e está muito dependente da disponibilidade proteica e energética desse cereal (Oria *et al.* 1995).

Como principais formas de consumo do sorgo podem referir-se as papas, as sêmolas, os produtos cozidos a vapor, os pães (fermentados ou não), as bebidas, as pipocas e as pastas. Os grãos de sorgo podem cozer-se inteiros ou podem ser moídos por métodos tradicionais ou industriais para obtenção de uma farinha.

O alimento mais simples e mais comum à base de sorgo são as papas. Estas podem ser mais ou menos consistentes, dependendo da razão água / farinha. As papas preparam-se adicionando, aos poucos e com agitação vigorosa, a farinha à água fervente até que se obtenha a consistência desejada. Exemplos de papas consistentes são o *tô* (Nigéria) e o *ugali*, (Quênia, Tanzânia e Uganda). Se ao *tô* for adicionado tamarindo ou sumo de limão este pode ser designado de *tô* ácido, caso se adicione cinza é designado *tô* alcalino. O *ugi* e o *ogi* são exemplos de papas menos consistentes. O *ogi* é uma papa fermentada, muito consumida na Nigéria (Murty e Kumar, 1995).

Em muitos países prepara-se uma sêmola de sorgo que é servida como o arroz. Esse produto é denominado *kichuri* em Bangladesh, *letha wagen* no Botswana, *kaoling mi fan* na China, *nifro* na Etiópia e *oka baba* na Nigéria (Subramanian *et al.* 1982).

Na África ocidental, a sêmola de sorgo é cozida a vapor para produzir um alimento espesso e uniformemente gelatinizado denominado *cuzcúz* (FAO, 1995).

A farinha de sorgo pode também ser usada para a produção de pão, podendo a massa ser ou não fermentada. Esses pães adquirem diversos nomes locais, como por exemplo *roti* e *chapatti* na Índia, *tuwo* nalgumas partes da Nigéria, *tortilla* na América central, *injera* na Etiópia e *kisra* no Sudão, estes dois últimos são exemplo de pães fermentados (FAO, 1995).

O sorgo também pode ser consumido na forma de bebidas tradicionais fermentadas: cerveja (*amgba*) e vinho (*affouk*). O *burukutu* é outro exemplo de cerveja de sorgo, consumida na Nigéria e Guiné (Chevassus-Agnes *et al.* 1976).

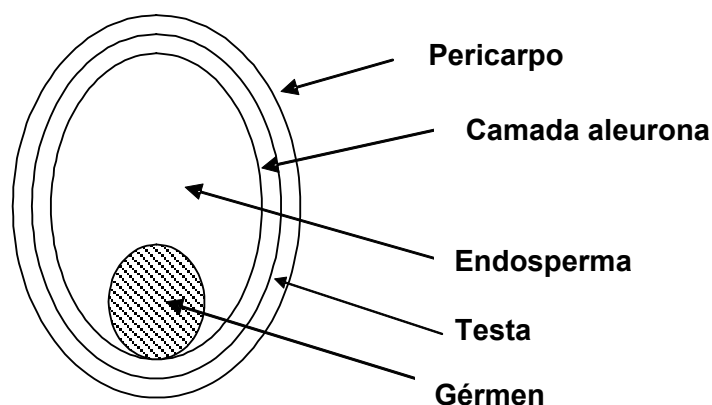
Os grãos verdes de sorgo podem ser tostados inteiros ou aquecidos a seco até rebentarem, processo que resulta na produção de pipocas. Este processo é muito comum na Índia e na África (Murty e Kumar, 1995).

O sorgo é ainda consumido na forma de pastas como o esparguete, embora seja menos indicado que o trigo por não conter glúten e por ter uma temperatura de gelatinização superior.

A partir da planta de sorgo (sorgo doce) podem, também, produzir-se xaropes, extrair açúcar ou até mesmo produzir álcool (Doggett, 1988).

## 1.3 Estrutura do grão de sorgo

Num corte longitudinal de um grão de sorgo, tal como nos restantes cereais, podem detectar-se três regiões distintas: pericarpo, gérmen e endosperma.



**Figura 1.1:** Representação esquemática de um grão de sorgo.

A distribuição relativas dos vários constituintes anatómicos do grão varia de variedade para variedade. Num grão de sorgo o peso médio do pericarpo é de 6%, o do endosperma é de 84% e o do gérmen 10% (Hubbard, *et al.*

1950). A proporção entre endosperma e gérmen, nos grãos de sorgo é, aproximadamente de 8,4:1.

O pericarpo é o elemento mais externo do grão, é constituído por três camadas: epicarpo, mesocarpo e endocarpo. O epicarpo divide-se em epiderme e hipoderme.

A epiderme é constituída por células grandes e rectangulares que apresentam um revestimento cutínico na superfície exterior. Na epiderme estão, frequentemente, presentes pigmentos. A hipoderme é constituída por células ligeiramente mais pequenas que a epiderme e pode apresentar até três camadas celulares.

O mesocarpo é a camada mais espessa do pericarpo. Do conjunto de todos os cereais o sorgo é o único que apresenta mesocarpo com pequenos grânulos de amido (1-4  $\mu\text{m}$ ). Nenhum outro cereal apresenta amido no pericarpo.

O endocarpo é a zona mais interna do pericarpo. É constituída por células transversais e por uma camada de células tubulares responsáveis pelo transporte de humidade ao grão.

Imediatamente abaixo do pericarpo está localizada a testa. Em certas variedades esta camada é bastante pigmentada, ou seja, apresenta elevada percentagem de taninos condensados (Hoseney *et al.* 1981). A coloração e o tipo de pigmento são uma característica genética. A espessura desta camada não é uniforme; é menos espessa na região do embrião e mais espessa na zona diametralmente oposta.

O endosperma é o constituinte mais abundante do grão. É um importante tecido de armazenamento, constituído por uma camada aleurona e por outras camadas mais internas; uma de textura córnea e outra de textura amilácea. Em todas as variedades de sorgo a aleurona é constituída por uma única camada que está localizada imediatamente abaixo da testa. As células da aleurona são ricas em minerais, vitamina B, lípidos e contêm, também, hidrolases.

O endosperma periférico é constituído por células rectangulares largas e dispostas de forma muito compacta. Apresenta grânulos de amido e corpos proteicos, envolvidos por uma matriz proteica (Hoseney *et al.* 1987). O amido presente nesta zona não está facilmente disponível para ataque enzimático, a

não ser que a matriz proteica seja previamente degradada (Chandrasekher e Kirleis, 1988).

A matriz proteica é constituída por glutelinas (Sekinger e Wolf, 1973) e os corpos proteicos por kafirinas (prolaminas do sorgo) (Hoseney *et al.* 1974); estas duas variedades de proteínas constituem a maior percentagem de proteínas do grão.

Os corpos proteicos presentes no endosperma de sorgo apresentam forma esférica e dimensões variáveis (2-3  $\mu\text{m}$ ) (Adams e Novellie, 1975). A dimensão depende da variedade de sorgo e varia também dentro do endosperma do próprio grão, as dimensões dos corpos proteicos podem ser variáveis. No endosperma amiláceo, o número de corpos proteicos diminui, ao mesmo tempo que a percentagem de amido aumenta.

Enquanto que no endosperma córneo os grânulos de amido apresentam uma forma poliédrica, no endosperma amiláceo os grânulos de amido apresentam uma forma esférica e tamanho superior aos do endosperma córneo (Hoseney *et al.* 1987). O amido desta região está mais sujeito a degradação enzimática (Sullins e Rooney, 1977).

A proporção entre endosperma córneo e amiláceo determina a textura do grão de amido. Nos grãos de textura mais mole o endosperma mais abundante é o endosperma amiláceo. A textura do grão é um dos parâmetros mais importantes e que determina a qualidade alimentar do grão de sorgo.

Quando o endosperma apresenta a cor amarela, significa que a espécie apresenta grande teor de carotenos e xantofilas (Hoseney *et al.* 1987).

A composição dos corpos proteicos do endosperma córneo é distinta da do endosperma amiláceo. O endosperma amiláceo possui 66-71% de kafirinas  $\alpha$ , 10-13% de kafirinas  $\beta$  e 19-21% de kafirinas  $\gamma$ . Por outro lado, as kafirinas  $\alpha$  representam 80-84% das proteínas do endosperma vítreo, as kafirinas  $\beta$  7-8% e as kafirinas  $\gamma$  9-12% (Watterson *et al.* 1993).

O gérmen é constituído pelo caulículo e pelo escutelo. O escutelo é um tecido de armazenamento rico em lípidos, proteínas, enzimas e minerais. Os lípidos presentes no gérmen de sorgo apresentam elevados teores em ácidos gordos poli-insaturados (FAO, 1995).



## 1.4 Comportamento da farinha de sorgo face ao cozimento

Como foi referido, a forma mais comum de processamento do sorgo passa pelo cozimento da sua farinha em água para a obtenção de papas. No entanto, sabe-se que este tipo de processamento promove uma redução significativa dos valores de digestibilidade proteica (Axtell *et al.* 1981; Eggum *et al.* 1983; Mitaru *et al.* 1985; Oria *et al.* 1995). Uma vez que os valores de digestibilidade são indicadores da disponibilidade proteica, esta característica pode ser considerada uma limitação nutricional de grande relevância.

Muitos estudos têm vindo a ser desenvolvidos na tentativa de entender qual/quais os factores responsáveis pela redução da digestibilidade do sorgo com o cozimento. Esses factores foram classificados por Duodu *et al.* (2003) em exógenos e endógenos.

Dentro dos factores exógenos podem incluir-se constituintes não proteicos do grão que, com o cozimento, possam interferir na digestão das proteínas, como por exemplo: estrutura organizacional do grão, polifenóis, ácido fítico, amido e polissacarídeos não amiláceos.

O inter-cruzamento por pontes de S-S ou de outra natureza, a hidrofobicidade das kafirinas e alterações da estrutura secundária das proteínas são considerados factores endógenos. Estes factores resultam de interacções que possam surgir entre proteínas de sorgo.

Pensa-se que, cada um destes factores isoladamente afecta a digestibilidade proteica do sorgo, no entanto acredita-se que mais de um factor estão na base da completa interpretação deste efeito induzido pelo cozimento.

Os mesmos autores propõem que o inter-cruzamento entre as proteínas seja o factor mais relevante em todo o processo. O inter-cruzamento pode ocorrer entre kafirinas  $\gamma$ - e  $\beta$ - localizadas na periferia do corpo proteico, podendo impedir que a região interior do corpo proteico ( $\alpha$ -kafirina) seja digerida.

## 1.5 Bibliografia

- Adams, C.A. e Novellie, L. (1975) Acid hydrolase and autolytic properties of protein bodies and spherosomes isolated from ungerminated seeds of *Sorghum bicolor* (L.) Moench, *Plant Physiol.*, **55**:7-11.
- Axtell, J.D.; Kirleis, A.W.; Hassen, M.M.; Mason, N.d'C., Mertz, E.T. e Munck, L. (1981) Digestibility of sorghum proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **78**(3): 1333-1335.
- Chandrasekher, G. e Kirleis, A.W. (1988) Influence of protein on starch gelatinization in sorghum, *Cereal Chem.*, **65**:457-462.
- Chevassus-Agnes, S.; Favier, J.C. e Joseph, A. (1976) Traditional technology and nutritive value of sorghum beer in Cameron, *Cah. Nutr. Diet.*, **11**: 89-104.
- Doggett, H. (1988) Sorghum, 2<sup>nd</sup> edn. Longman Scientific and Technological, London.
- Duodu, K.G.; Taylor, J.R.N.; Belton, P.S. e Hamaker, B.R. (2003) Factors affecting sorghum protein digestibility, *J. Cereal Sci.*, **38**:117-131.
- Eggum, B.O.; Monowar, L.; Bach Knudsen, K.E.; Munck, L. e Axtell, J.D. (1983) Nutritional quality of sorghum foods from Suthan, *J. Cereal Sci.*, **1**: 127-137.
- FAO (1995) El Sorgo y el Mijo en la Nutrición Humana, Organizacion de las naciones unidas para la agricultura y la alimentation, Roma.
- Harlan, J.R. (1971) Agricultural origins: centers and non-centers. *Science* **174**: 468-474.
- Hoseney, R.C.; Andrews, D.J. e Clark, H. (1987) Sorghum and pearl millet in Nutritional quality of cereal grains: genetic and agronomic improvement (R.A. Olson and K.J. Frey, eds.) American Society of Agronomy, Crop Science of America, Soil Science of America, Madison, Wisconsin, USA.
- Hoseney, R.C.; Davis, A.B. e Dendy, D.A.V. (1981) Sorghum and millets in Advances in cereal science and technology, vol. IV (Y. Pomeranz, Ed.) American Association of Cereal Chemist, St. Paul.
- Hoseney, R.C.; Davis, A.B. e Harbers, L.H. (1974) Pericarp and endosperm structure of sorghum grain shown by scanning electron microscopy, *Cereal Chem.*, **51**:552-558.

- Hubbard, J.E.; Hall, H.H. e Earle, F.R. (1950) Composition of the component parts of the sorghum kernel, *Cereal Chem.*, **27**:415-420.
- Mitaru, B.N.; Reichert, R.D. e Blair, R. (1985) Protein and amino acid digestibilities for chickens of reconstituted and boiled sorghum grains varying in tannin contents, *Poultry Sci.*, **64**: 101-106.
- Murty, D.S e Kumar, K.A. (1995) Traditional uses of sorghum and millets *em* Sorghum and millets: chemistry and technology (D.A.V. Dendy, Ed.) American Association of cereal chemists Inc., St. Paul, Minesota, USA.
- National Research Council (1996) Lost crops of Africa, Vol.1. National Academy Press, Washington D.C.
- Oria, M.P.; Hamaker, B.R. e Shull, J.M. (1995) Resistance of sorghum  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  kafirins to pepsin digestion, *J. of Agric. Food Chem.*, **43**:2148-2153.
- Rosenow, D.T.; Ejecta, G.; Clark, L.E.; Bindinger, F.R. e Harris, D. (1997) Breeding for pre- and post-flowering drought stress in sorghum *in* Proceedings of the international conference on genetic improvement of sorghum and pearl millet. Lubbock, TX, pp 400-411.
- Sekinger, H.L. e Wolf, M.J. (1973) Sorghum protein ultrastructure as it relates composition, *Cereal Chem.*, **50**:455-465.
- Serena-Saldivar, S.O. e Rooney, L.W. (1995) Structure and chemistry of sorghum and millets *in* Sorghum and millets: chemistry and technology (D.A.V. Dendy, Ed.) American Association of cereal chemists Inc., St. Paul, Minesota, USA.
- Subramanian, V.; Murty, D.S.; Jambunathan, R. e House, L.R. (1982) Boiled sorghum characteristics and their relationship to starch properties *em* Proceedings of the International Symposium on Sorghum Grain Quality (L.W. Rooney e D.S. Murty, eds.) ICRISAT, Patancheru, A. P., Índia.
- Sullins, R.D. e Rooney, L.W. (1977) Pericarp and endosperm structure of pearl millet *in* Proceedings of a simposium on sorghum and millets for human food (Dendy, D.A.V.) Viena, 11-12 of May.



## Objectivos

Muito trabalho tem vindo a ser desenvolvido numa tentativa de encontrar a origem da diminuição da digestibilidade com o cozimento. Apesar de se continuar a desenvolver pesquisa neste tópico, há informações contraditórias e ainda não existe uma explicação definitiva para o fenómeno.

Este trabalho tem como principal objectivo contribuir para a compreensão dos factores inerentes à baixa digestibilidade do sorgo de modo a sugerir formas de solucionar o problema e tentar auxiliar futuros estudos agronómicos e genéticos de aplicabilidade em países produtores de sorgo. Para tal, pretende estudar-se o efeito de diversos factores endógenos e exógenos que possam de alguma forma estar associados, isoladamente ou em sinergia, à redução da digestibilidade. Foram objecto de estudo quatro variedades de sorgo (NK283, K LW, KAT369 e PAN8569) que foram gentilmente cedidas pelo Prof. John Taylor da Universidade de Pretória na África do Sul.

Os objectivos principais deste trabalho são:

- Efectuar uma caracterização espectroscópica das amostras de farinha antes e após o cozimento. De modo a começar o trabalho do todo para o pormenor, pretende estudar-se, de forma não invasiva, os efeitos do cozimento na amostra, numa tentativa de identificar as modificações ocasionadas nos constituintes.
- Estudar aprofundadamente a fracção de kafirinas. Estas proteínas foram identificadas como as principais envolvidas na redução da digestibilidade proteica e, como tal, é necessário conhecê-las pormenorizadamente e identificar possíveis alterações quando cozidas.
- Determinar valores de digestibilidade das amostras utilizadas no decorrer do trabalho.

- Identificar qual o obstáculo que as enzimas digestivas (pepsina em particular) encontram ao digerirem as proteínas da farinha de sorgo. Para tal pretende efectuar-se um estudo de digestibilidade sequencial *in vitro* acompanhado por caracterização electroforética das amostras não digeridas.
- Estudar a influência de factores exógenos à proteína (compostos fenólicos e lípidos) nos valores de digestibilidade proteica.

Todo este estudo é desenvolvido tendo sempre como termo de comparação o milho. Este cereal pertence à mesma família do sorgo e apesar de diversas similaridades não apresenta redução dos valores de digestibilidade com o cozimento.

# Caracterização química das amostras

## 3.1 Introdução

O sorgo, à semelhança dos outros cereais, é predominantemente amiláceo. O conteúdo em proteína e gordura destes grãos é comparável ao milho e ao trigo (Tabela 3.1).

**Tabela 3.1:** Composição dos nutrientes do sorgo e outros cereais em 100 g de porção comestível e 12% de humidade (Hulse *et al.* 1980).

Cereal	Proteína <sup>a</sup> (g)	Gorduras (g)	Cinza (g)	CHO <sup>b</sup> (g)	Fibra crua (g)
Arroz	7,9	2,7	1,3	76,0	1,0
Trigo	11,6	2,0	1,6	71,0	2,0
Sorgo	10,4	3,1	1,6	70,7	2,0
Milho perla	11,8	4,8	2,2	67,0	2,3
Milho comum	12,5	3,5	3,1	63,8	5,2

<sup>a</sup> N x 6,25

<sup>b</sup> Hidratos de Carbono

### 3.1.1 Hidratos de Carbono

A principal forma de armazenamento de hidratos de carbono no sorgo é o amido. O amido é constituído por duas cadeias poliméricas: a amilopectina – cadeia ramificada de glucose, e a amilose – polímero de cadeia linear. O

conteúdo em amido no sorgo varia de 32 a 79% (El Tinay *et al.* 1979). No sorgo, o amido apresenta-se em grânulos de forma poligonal e esférica, com tamanhos que variam de 4 a 24 µm de diâmetro (Miller e Burns, 1970).

O amido apresenta pouca capacidade de absorção de água à temperatura ambiente, bem como um pequeno potencial de inchamento. A absorção de água aumenta, no entanto, com a temperatura, observando-se a solubilização da amilose e da amilopectina. A esse fenómeno, dá-se o nome de gelatinização do amido. Factores ambientais e genéticos influenciam a temperatura de gelatinização do amido, bem como a razão amilose/amilopectina. A temperatura de gelatinização do amido do sorgo varia de 63 a 72 °C (Freeman *et al.* 1968).

McNeill *et al.* (1975) sugeriram que, aquando da preparação de alimentos à base de sorgo, o cozimento permite que os grãos de amido se libertem da matriz proteica, tornando-se mais acessíveis ao ataque enzimático.

Para além do amido, os grãos de sorgo maduros contêm ainda açúcares solúveis, pentosanas, celulose e hemicelulose.

Os principais açúcares solúveis redutores são a glucose e a frutose, com níveis que variam de 0,2 a 0,9% (Hoseney *et al.* 1987). No grão não germinado pode encontrar-se ainda maltose.

Em níveis superiores, 0,3 a 2,1%, aparecem os açúcares solúveis não redutores (El Tinay *et al.* 1979). O principal açúcar não redutor é a sacarose, que representa 75% dos açúcares solúveis. No grão imaturo existem ainda pequenas quantidades de oligossacarídeos, a maior parte dos quais constituídos por glucose e frutose, com preponderância da última.

### 3.1.2 Proteína total

O conteúdo em proteínas do sorgo (N x 6,25) é variável, podendo oscilar entre 7 e 14% (Hoseney *et al.* 1987). Essa variação deve-se a factores genéticos e ambientais, tendo também influência a data do cultivo, o tamanho da semente, a temperatura e, obviamente, o nível de fertilização com azoto (Burleson *et al.* 1956; Waggle *et al.* 1967).



Estudos feitos com duas espécies de sorgo de baixo teor em taninos, revelaram que aproximadamente 80% das proteínas se situam no endosperma do grão, 16% no gérmen e apenas 3% no pericarpo (Taylor e Schüssler, 1986).

O gérmen é rico em albuminas e globulinas, enquanto que o endosperma é rico em kafirinas (as prolaminas de sorgo) e glutelinas (Warsi e Wright, 1973).

No que diz respeito aos teores de cada tipo de proteínas sabe-se que as albuminas constituem entre 2-9% da proteína total do grão, as globulinas 12,9-16%, as prolaminas 27-43,1% (podendo chegar a atingir valores bem mais elevados) e as glutelinas 26,1% (Naik 1968).

### 3.1.3 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos (flavonóides) encontram-se amplamente distribuídos nas plantas, são metabolitos secundários resultantes de intermediários da biossíntese de aminoácidos aromáticos (fenilalanina) e do ciclo de Krebs (acetilCoA).

Os compostos fenólicos podem dividir-se em flavonóis, antocianidinas, proantocianidinas, 3-desoxiantocianidinas e isoflavonóides.

Os flavonóis são compostos que absorvem luz UV/Vis. As antocianidinas são pigmentos vermelhos, azuis e púrpura de elevado poder antioxidante (Shirley 1998).

As proantocianidinas, também designadas por taninos condensados, geralmente são polímeros de poli-hidroxi-flavano-3,4-diol, de hidroxi-flavano-3-ol, ou destes dois tipos de compostos e, apresentam cor castanha (Hoseney *et al.* 1987). Têm como principal função a defesa da planta e possuem a capacidade de inibir o crescimento de agentes patogénicos. Se plantas com proantocianidinas forem consumidas por animais herbívoros, ligam-se a proteínas e polissacarídeos e podem interferir na sua actividade enzimática (Shirley 1998). As proantocianidinas são distintas dos taninos hidrolisáveis, estes são constituídos por unidades de ácido fenolcarboxílico ligadas a uma unidade de açúcar. São denominados hidrolisáveis porque podem ser

hidrolisados por enzimas ou ácidos. Os taninos condensados não contêm unidades de açúcar e não são hidrolisáveis por enzimas. Quando tratados com ácidos, os taninos condensados decompõem-se para formar pequenas quantidades de antocianidinas, daí serem designados por proantocianidinas.

As 3-desoxiantocianidinas são produzidas por um número restrito de plantas (milho e sorgo). Os isoflavonóides estão presentes em sementes de leguminosas e possuem propriedades antifúngicas e antioxidantes (Shirley 1998).

Os flavonóides do sorgo podem ser divididos em três grupos: apigeninidinas, flavalo-4-óis (antocianidinas) e proantocianidinas (Shirley 1998). Jambunathan *et al.* (1986) observaram que a resistência ao amolecimento do grão está associada ao conteúdo de flavano-4-ol no grão.

O sorgo é o único cereal capaz de produzir quantidades relativamente grandes de taninos condensados (Elkin *et al.* 1996). Os taninos têm a particularidade de proteger o grão do ataque dos pássaros e insectos e de prevenir a germinação pré-colheita. No entanto, as suas vantagens agronómicas vêm acompanhadas de desvantagens nutricionais e de uma diminuição na qualidade dos alimentos (Serna-Saldivar e Rooney, 1995).

As variedades estudadas ao longo deste trabalho foram escolhidas por não possuírem, na sua composição, taninos condensados.

### 3.1.4 Lípidos

No sorgo podemos encontrar lípidos polares (fosfolípidos e glicolípidos), lípidos apolares (triglicerídeos e ácidos gordos) e lípidos insaponificáveis (fitoesteróis, carotenoides e tocoferóis) (Serna-Saldivar e Rooney, 1995). Os mais abundantes são, sem dúvida os lípidos apolares (86%), estes lípidos apresentam um elevado grau de insaturação. Os triglicerídeos representam a maior porção de lípidos apolares. O ácido oleico e linoleico correspondem a 76% do total de ácidos gordos (Hoseney, 1987).

### 3.1.5 Fibra

O termo fibra dietética abrange uma variedade de polissacarídeos vegetais, em particular a celulose, hemicelulose, pectinas, oligossacarídeos, gomas e vários compostos lenhificados, não hidrolisados pelas enzimas do tracto digestivo humano.

A principal fibra dietética no sorgo é a celulose. Encontra-se sobretudo no pericarpo e com uma variação de 1,2 a 5,2%. As hemiceluloses ou pentosanas aparecem no sorgo como componentes da parede celular. O grão do sorgo contém de 2,5 a 5,6% de pentosanas (Hoseney *et al.* 1987).

### 3.1.6 Vitaminas e minerais

O sorgo é em geral uma importante fonte de vitamina B. Algumas variedades de sorgo de endosperma amarelo contêm  $\beta$ -caroteno, que pode ser convertido em vitamina A pelo corpo humano. No entanto, dada a natureza fotossensível dos carotenos e à variabilidade devida a factores ambientais, torna-se relativa a importância destas variedades de sorgo como fonte alimentar de vitamina A (FAO, 1995).

Tanner *et al.* (1947) verificaram que o sorgo, quando comparado com o milho, contém níveis similares de riboflavina, tiamina e piridoxina, níveis inferiores de caroteno e níveis superiores de ácido pantoténico, niacina, colina, ácido fólico e biotina. O sorgo, tal como se consome normalmente, não é uma fonte de vitamina C.

A composição mineral dos grãos de sorgo apresenta grandes variações. As condições ambientais das zonas de cultivo são mais determinantes na quantidade e tipo de elementos vestigiais existentes no sorgo, do que os factores genéticos (Hoseney, 1987).

O conteúdo em minerais do sorgo varia de 1,2 a 2,2%. No grão a matéria mineral está desigualmente distribuída, sendo mais concentrada no gérmen e no revestimento da semente. Hubbard *et al.* (1950) assinalaram a seguinte distribuição dos minerais nas diferentes partes do grão: 69% no gérmen, 21%

no endosperma e 10% no pericarpo. Os principais minerais do sorgo são o fósforo e potássio. Segundo Kurien *et al.* (1960), mais de 70% do fósforo encontra-se na forma de fitato, que pode interferir na absorção de cálcio e outros minerais. O sorgo é ainda uma fonte importante de mais de 20 micronutrientes.

## 3.2 Metodologia

Neste capítulo procedeu-se à quantificação dos componentes das amostras que se julgou serem de maior utilidade para o presente trabalho. Sendo assim, quantificou-se o amido, proteína, taninos e lípidos. Os extractos de taninos e de lípidos foram também caracterizados espectroscopicamente.

- 1º Preparação das amostras de farinha.
- 2º Quantificação de amido.
- 2º Quantificação de proteína total.
- 3º Quantificação de lípidos.
- 4º Quantificação de taninos.
- 5º Quantificação da humidade.
- 6º Caracterização espectroscópica dos extractos de lípidos e de taninos.

### 3.2.1 Preparação das amostras

Os grãos de sorgo e de milho (Milho, NK283, KWL, KAT369 e PAN8564) foram fornecidos pela Universidade da Pretória (África do Sul). Após terem sido moídos num moinho de café, foram peneirados num peneiro mecânico para obtenção de uma farinha com granulometria  $\leq 400 \mu\text{m}$ .

### 3.2.2 Quantificação de amido

O teor em amido das amostras foi determinado recorrendo a um kit de determinação de amido total (Megazyme).

### 3.2.3 Quantificação de proteína total

A quantificação da proteína total das amostras foi determinada recorrendo a determinação de azoto total por Kjeldahl. A conversão de azoto total para proteína foi efectuada utilizando o factor de conversão convencional para cereais de 6,25 (Norma portuguesa nº 1996).

### 3.2.4 Quantificação de lípidos

300 mg de farinha foram extraídas com 1 mL de clorofórmio e, após 30 minutos de extracção, a mistura foi filtrada. O procedimento foi repetido mais duas vezes, os sobrenadantes foram juntos e evaporados até à secura. Os lípidos foram determinados gravimetricamente. Com esta extracção com clorofórmio foram extraídos da farinha os lípidos polares, livres e associados.

### 3.2.5 Quantificação de compostos fenólicos

250 mg de farinha foram extraídas com 1 mL de metanol ácido (1% de HCl) e, após 30 minutos de extracção, a mistura foi centrifugada. O procedimento foi repetido mais duas vezes, os sobrenadantes foram juntos e submetidos a quantificação de compostos fenólicos pelo método do Azul de Prússia (Price *et al.* 1979). Os compostos fenólicos foram determinados em equivalentes de ácido tanínico. Este método redox detecta a presença de qualquer tipo de composto fenólico (Price *et al.* 1979).

### 3.2.6 Quantificação de humidade

As amostras foram secas em estufa de vazio a 30°C até peso constante.

Todas as determinações foram efectuadas em triplicado. Os resultados foram expressos em termos das médias das três réplicas e dos respectivos desvios-padrão.

### 3.2.7 Caracterização espectroscópica dos extractos de lípidos e de compostos fenólicos

Para caracterização dos extractos foram adquiridos os respectivos espectros de FT-IR, após evaporação do solvente.

Os espectros foram adquiridos na gama de 4000 a 500  $\text{cm}^{-1}$  (na gama de infravermelho médio) com resolução de 8  $\text{cm}^{-1}$  num espectrómetro Bruker IFS 55 com acessório Golden Gate (sistema de ATR de reflexão única), com acumulação de 256 scans. Foram realizadas cinco réplicas de cada amostra.

## 3.3 Resultados e discussão

De acordo com a metodologia descrita anteriormente obtiveram-se os resultados apresentados na Tabela 4.2.

Os valores apresentados em cada linha da coluna não perfazem 100% uma vez que há constituintes da farinha que não foram analisados, nomeadamente, vitaminas, açúcares livres e polissacarídeos que não amido.

A amostra com maior teor em amido é a NK283. No que diz respeito à proteína é a amostra KAT369 que tem maior quantidade.

**Tabela 3.2:** Resultados da análises químicas a que foram submetidas as variedades de farinha estudadas.

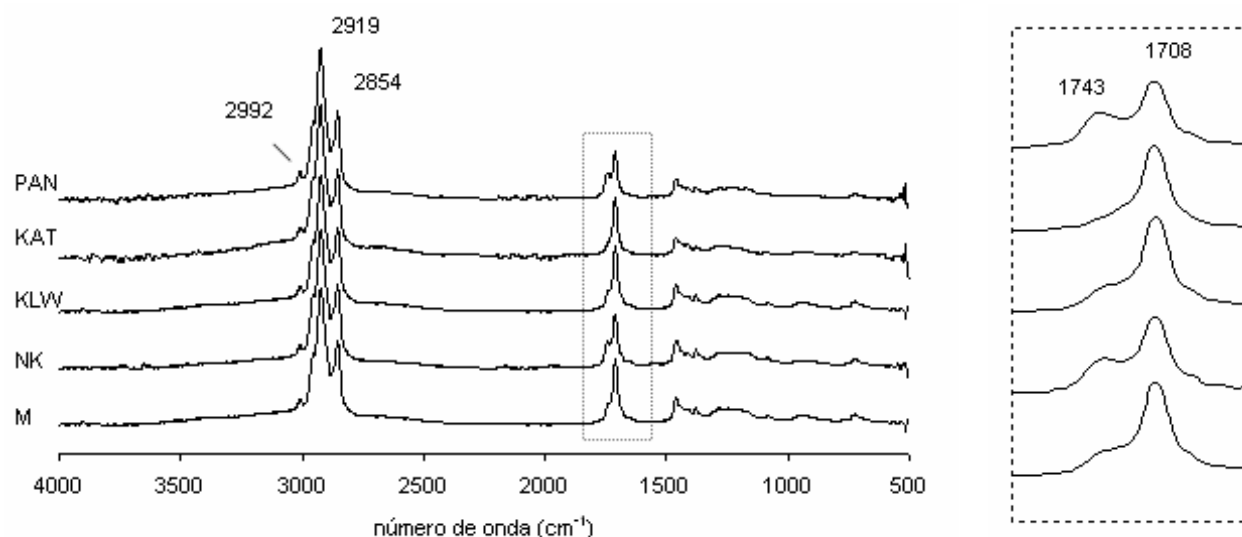
	Amido	Proteína total <sup>a</sup>	Lípidos	Compostos fenólicos	Humidade
Amostra	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
<b>Milho</b>	49,81 ± 7,08	10,12 ± 0,19	6,83 ± 0,74	0,39 ± 0,007	1,67 ± 0,02
<b>NK283</b>	61,37 ± 7,72	7,39 ± 0,02	4,88 ± 0,53	0,27 ± 0,002	1,94 ± 0,05
<b>KLW</b>	52,94 ± 2,45	8,68 ± 0,05	3,98 ± 0,67	0,42 ± 0,025	2,10 ± 0,06
<b>KAT369</b>	57,83 ± 0,33	10,79 ± 0,07	4,27 ± 0,25	0,27 ± 0,011	1,44 ± 0,04
<b>PAN8569</b>	54,04 ± 0,98	7,79 ± 0,08	5,95 ± 0,21	0,47 ± 0,032	1,85 ± 0,01

<sup>a</sup> N x 6,25

O milho é a variedade de farinha estudada que contém maior teor em lípidos extractáveis com clorofórmio e, no que diz respeito a compostos de natureza fenólica, a variedade PAN8569 é a mais rica.

### 3.3.1 Caracterização do extracto lipídico

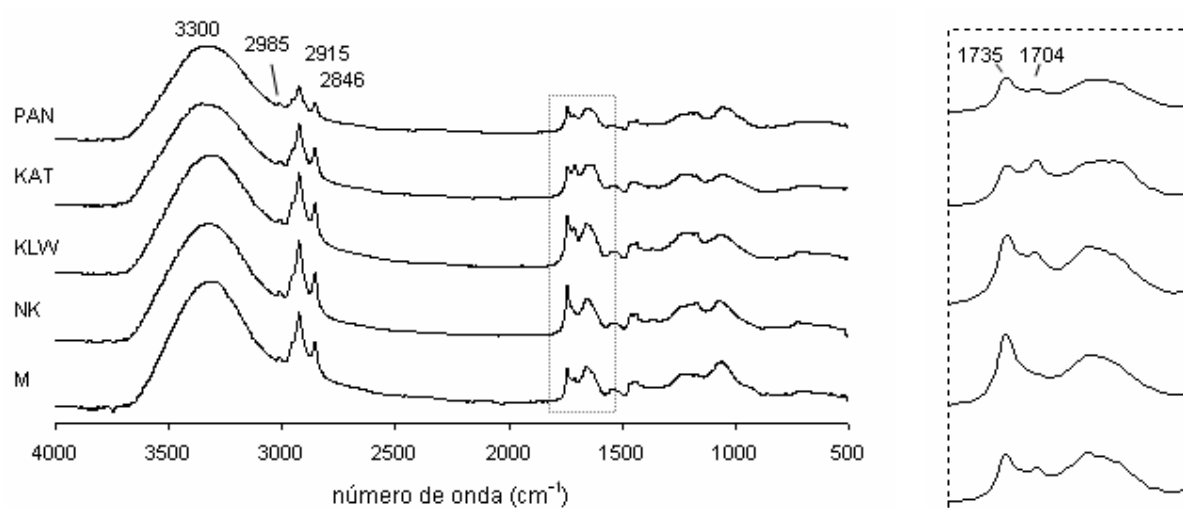
Nos espectros dos extractos obtidos após extracção com clorofórmio pode detectar-se a presença de picos localizados a 2992 cm<sup>-1</sup> correspondentes à presença de duplas ligações (-C=C-). Os sinais a 2919 e 2854 cm<sup>-1</sup> correspondem respectivamente a grupos -CH<sub>2</sub> e -CH<sub>3</sub>. Os sinais a 1743 cm<sup>-1</sup> denunciam a presença de grupos éster provenientes de triglicéridos. A presença de sinais a 1711 cm<sup>-1</sup> indicam que, para além de triglicéridos, foram extraídos outros compostos. A este número de onda poderá estar associada a presença de mono-acil lípidos fosforilados ou não; que são constituintes usuais da fracção lipídica de cereais e ainda ácidos gordos (Galliard *et al.* 1987).



**Figura 3.1:** Espectros de FT-IR dos extractos de clorofórmio.

### 3.3.2 Caracterização do extracto de compostos fenólicos

Os espectros obtidos para os extractos metanólicos estão apresentados na Figura 3.4.



**Figura 3.2:** Espectros de FT-IR dos extractos de metanol ácido.



Os espectros dos referidos extractos revelaram a presença de sinais a  $3309\text{ cm}^{-1}$  denunciando a presença de grupos  $\text{-OH}$ , presentes em elevado número nos compostos fenólicos. Este sinal pode também ser revelador de água na amostra. Uma vez que a amostra foi seca no cristal, durante a secagem pode ter ocorrido troca metanol - água. Existem outros sinais a  $2989$ ,  $2915$  e  $2846\text{ cm}^{-1}$ , correspondentes à presença de  $\text{-C=C-}$ ,  $\text{-CH}_2$  e  $\text{-CH}_3$ , respectivamente.

Para além destes sinais existem outros indicadores da presença de compostos fenólicos. A  $1735\text{ cm}^{-1}$  é indicada a presença de grupos dicetónicos vicinais resultantes da oxidação de alguns grupos  $\text{-OH}$  dos compostos fenólicos. O sinal a  $1704\text{ cm}^{-1}$ , neste caso, poderá ser atribuída à presença de ácidos gordos.

### 3.4 Bibliografia

- Burleson, C.A.; Cowley, W.R. e Otey, G. (1956) Effect of nitrogen fertilization on yield and protein content of grain sorghum in the lower Rio Grande valley of Texas, *Agron. J.*, **48**: 524-525.
- El Tinay, A.H.; Abdel Gadir, A.M. e El Hidai, M. (1979) Sorghum fermented kisra bread, I.- Nutritive value of kisra, *J. Sci. Food Agric.*, **30**: 859-863.
- Elkin, A.R.G.; Freed, M.B.; Hamaker, B.R.; Zhang, Y. e Parsons, C.M. (1996) Condensed tannins are only partially responsible for variations in nutrient digestibilities of sorghum grain cultivars, *J. Agric. Food Chem.*, **44**: 848-853.
- FAO (1995) El sorgo y el mijo en la nutrición humana, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Roma.
- Freeman, J.E.; Kramer, N.W. e Watson, S.A. (1968) Gelatinization of starches from corn (*Zea mays* L.) and sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench). Effects of genetic and environmental factors, *Crop Sci.*, **8**: 409-413.
- Galliard, T. e Bowler, P. (1987) Morphology and composition of starch *in* Starch: properties and potential (T.Galliard Ed.) Vol. 13 Jhon Wiley & Sons, USA, 55-78.

- Hoseney, R.C.; Andrews, D.J. e Clark, H (1987) Sorghum and pearl millets *em* Nutricional quality of cereal grains: genetic and agronomic improvement (R.A. Olson e K.J. Frey, eds.) American Society of Agronomy, Crop Science of America, Soil Science of America, Madison, Wisconsin, USA.
- Hubbard, J.E.; Hall, H.H. e Earle, F.R. (1950) Composition of the component parts of the sorghum kernel, *Cereal Chem.*, **27**: 415-420.
- Hulse, J.H.; Laing, E.M. e Pearson, O.E. (1980) Sorghum and the millets: their composition and nutritive value, Academic Press, New York.
- Jambunathan, R.; Butler, L.G.; Bandyopadhyay, R. e Mughogho, L.K. (1986) Polyphenol concentrations in grain, leaf and callus tissues of mold-susceptible and mold resistant sorghum cultivars, *J. Agric. Food Chem.*, **34**: 425-429.
- Kurien, P.P; Narayanarao, M.; Swaminathan, M. e Subrahmanyam, V. (1960) The metabolism of nitrogen, calcium and phosphorus in undernourished children, *Br. J. Nutr.*, **14**: 339-345.
- McNeill, J.W.; Potter, G.D.; Riggs, J.K. e Rooney, L.W. (1975) Chemical and physical properties of processed sorghum grain carbohydrates, *J. Anim. Sci.*, **40**: 335-341.
- Miller, O.H. e Burns, E.E. (1970) Starch characteristics of selected grain sorghums as related to human foods, *J. Food Sci.*, **35**: 666-668.
- Naik, M.S.(1968) Lysine and tryptophan in protein fractions of sorghum, *Indian J. Genet. Plant Breed*, **28**:142-146.
- Norma portuguesa (1982) Determinação do teor de proteína bruta em cereais e leguminosas, *Normas portuguesas* N°1996.
- Price, M.L. e Butler, L.G. (1979) Rapid visual estimation and spectrophotometric determination of tannin content of sorghum grain, *J.Agric. Food Chem.*, **25**:1268-1273.
- Serna-Saldivar, S.O. e Rooney, L.W. (1995) Structure and chemistry of sorghum and millets *em* Sorghum and millets: chemistry and technology (D.A.V. Dendy, ed) American Association of cereal chemists Inc., St. Paul, Minnesota, USA.
- Shirley, B. S. (1998) Flavonoids in seeds and grains: physiological function, agronomic importance and the genetics of biosynthesis, *Seed Science Research*, **8**: 415-422.

- Tanner, F.W.Jr.; Pfeiffer, S.E. e Curtis, J.J. (1947) B-complex vitamins in grain sorghums, *Cereal Chem.*, **24**: 268-274.
- Taylor, J.R.N. e Schussler, L. (1986) The protein compositions of the different anatomical parts of sorghum grain, *J. Cereal Sci.*, **4**: 361-369.
- Waggle, D.H.; Deyoe, C.W. e Smith, F.W. (1967) Effect of nitrogen fertilization on the amino acid composition and distribution in sorghum grain, *Crop Sci.*, **7**: 367-368.
- Warsi, A.S. e Wright, B.C. (1973) Effects of rates and methods of nitrogen application of sorghum grain, *Indian J. Agric. Sci.*, **43**:722-726.



# Caracterização espectroscópica das amostras

## 4.1 Introdução

As técnicas espectroscópicas são de grande utilidade quando se pretende efectuar uma primeira abordagem, não destrutiva, das amostras. Essas técnicas, para além de permitirem uma caracterização imediata dos constituintes das amostras, permitem ainda identificar o efeito de certos tratamentos, a que a amostra é submetida, nos referidos constituintes.

Quando as técnicas espectroscópicas são acopladas a técnicas multivariadas constituem excelentes ferramentas que permitem analisar um conjunto vasto de amostras, assim como a identificação de características particulares de cada uma delas.

A espectroscopia de FT-IR pode ser aplicada como um método não destrutivo para auxiliar a interpretar o comportamento de um sistema tão complexo como a farinha. A espectroscopia de RMN de estado sólido pode ser também aplicada com o mesmo objectivo e pode servir ainda para complementar a informação obtida por FT-IR.

A diversidade genética do sorgo torna-o bastante difícil de classificar, então, para o estudo de diversas variedades de sorgo assim como para a distinção entre amostras de farinha de sorgo e de milho, a aplicação destas ferramentas pode ser decisiva.

Como foi referido, a digestibilidade do sorgo diminui drasticamente com o cozimento, a observação das alterações induzidas pelo cozimento nos diversos constituintes da farinha, possível através de espectroscopia / análise multivariada, pode auxiliar na compreensão do referido fenómeno.

Estudos anteriores, realizados com FTIR e RMN  $^{13}\text{C}$ , revelaram que com o cozimento ocorrem alterações nas estruturas das proteínas do sorgo, passando parcialmente de estruturas em  $\alpha$ -hélice para folhas  $\beta$ , e com formação de pontes dissulfeto (Duodu *et al.* 2001). No entanto, essas mesmas alterações também foram verificadas para o milho e para mutantes de sorgo com elevada digestibilidade. Isto sugere que outros factores, que não apenas a alteração da estrutura secundária das proteínas, podem estar na origem da diminuição dos valores de digestibilidade proteica com o cozimento.

## 4.2 Metodologia

- 1º Preparação das amostras de farinha crua e cozida.
- 2º Análise das amostras por FT-IR.
- 3º Análise das amostras por RMN  $^{13}\text{C}$ : CP-MAS e SPE.
- 4º Cruzamento de informação de FT-IR com RMN  $^{13}\text{C}$  (FT-IR $\otimes$ RMN  $^{13}\text{C}$ ).

### 4.2.1 Preparação das amostras de farinha

Os grãos de sorgo e de milho (Milho, NK283, KIW, KAT369 e PAN8564) foram fornecidos pela Universidade da Pretória (África do Sul). Após terem sido moídos num moinho de café foram peneirados num peneiro mecânico para obtenção de uma farinha com granulometria  $\leq 400\ \mu\text{m}$ .

Para a obtenção de farinha cozida as amostras de farinha foram misturadas com água na proporção de 1:10 e colocadas em banho fervente durante 20 minutos. Após o arrefecimento das amostras, à temperatura ambiente, estas foram congeladas e em seguida liofilizadas de forma a não haver perda de massa.

A farinha de milho foi estudada de forma a servir como sistema referencia.

#### 4.2.2 Ensaios de FT-IR

Os espectros das farinhas de sorgo e milho cruas e cozidas foram adquiridos na gama de 4000 a 500  $\text{cm}^{-1}$  (na gama de infravermelho médio) com resolução de 8  $\text{cm}^{-1}$  num espectrómetro Bruker IFS 55 com acessório Golden Gate (sistema de ATR de reflexão única), com acumulação de 256 scans. Foram realizadas cinco réplicas de cada amostra.

Os espectros de FT-IR foram submetidos a uma análise exploratória – análise em componentes principais (PCA) (Jolliffe 1986).

#### 4.2.3 Ensaios de RMN $^{13}\text{C}$

Para cada variedade de farinha, crua e cozida, foram efectuadas duas experiências de RMN  $^{13}\text{C}$  de estado sólido: polarização cruzada e rotação segundo o ângulo mágico (CP-MAS) e excitação com pulso único (SPE). Em alguns casos houve necessidade de efectuar réplicas de modo a confirmar a localização de certos sinais, a reprodutibilidade revelou-se um problema devido à heterogeneidade da amostra. Os espectros de CP-MAS  $^{13}\text{C}$  revelam os constituintes rígidos da farinha enquanto que as experiências de SPE  $^{13}\text{C}$ , adquiridas com intervalo entre aquisições curtos, permitem visualizar apenas os carbonos mais móveis; ou seja aqueles com  $T_1$  de relaxação suficientemente curtos para serem recuperados durante o intervalo entre aquisições (4-5 s).

Ambas as experiências foram realizadas num espectrómetro Bruker AVANCE 400 (DRX) operando a 400 MHz para a frequência do protão, com uma sonda de 7 mm e com as seguintes condições de aquisição: rotação da amostra de 4,5 kHz, pulso de 90° de 4 ms, contacto de 1 ms, intervalo entre aquisições de 5 s e 3 s para CP-MAS e SPE, respectivamente.

#### 4.2.4 Análise quimiométrica

Os espectros de FT-IR obtidos foram transferidos para um programa de análise. Para a análise em componentes principais foi utilizada a região de 1834 - 505  $\text{cm}^{-1}$ . No que diz respeito aos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  foi utilizada a região de 0-200 ppm.

Em ambos os casos os sinais foram pré-tratados recorrendo ao método SNV (centrar e reduzir). Esta análise permite a caracterização das relações entre amostras (coordenadas factoriais) recuperando os respectivos sub-espectros (contribuições factoriais), através da análise em componentes principais (PCA) (Jolliffe 1986).

O produto de todas as combinações entre dois domínios (FT-IR e SPE  $^{13}\text{C}$ ) foram determinadas para cada amostra de acordo com o procedimento descrito por Rutledge *et al.* (2001) de forma a obter a matriz OP. A matriz assim obtida é usada para avaliar possíveis relações entre os sinais de ambos os domínios estudados.

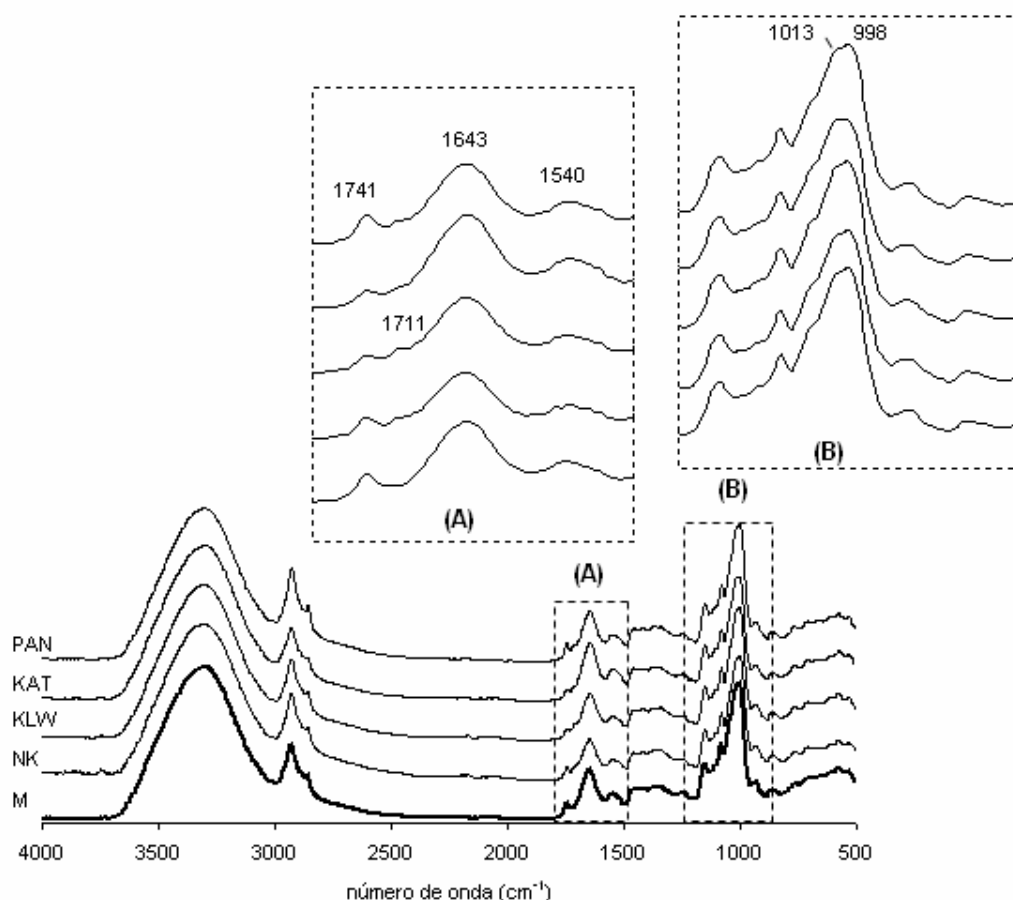
### 4.3 Resultados e discussão

#### 4.3.1 Análise directa de espectros de FT-IR

##### 4.3.1.1 Amostras cruas

Os espectros de FT-IR obtidos para o sorgo e para o milho são análogos aos restantes cereais. Na Figura 4.1 são apresentados os espectros das quatro variedades de sorgo estudadas, o espectro do milho é utilizado como termo de comparação. Do espectro total podem ser evidenciadas duas regiões de maior interesse: a região 1800-1450  $\text{cm}^{-1}$  (Figura 4.1 A) correspondente à absorção da proteína e a região 1200-800  $\text{cm}^{-1}$  (Figura 4.1 B) atribuída à absorção de polissacarídeos.





**Figura 4.1:** Espectros de FT-IR de amostras de farinha de milho e sorgo cruas. **(A)** Expansão correspondente à região espectral das proteínas ( $1800\text{--}1450\text{ cm}^{-1}$ ) e **(B)** expansão da região espectral correspondente à região do amido ( $1200\text{--}800\text{ cm}^{-1}$ ).

Relativamente aos sinais referentes às proteínas pode dizer-se que eles provêm maioritariamente das prolaminas (zeínas e kafirinas), uma vez que estas são as proteínas mais abundantes tanto no milho como no sorgo (Paulis *et al.* 1979). Os sinais correspondentes à proteínas são vulgarmente designados Amida I e Amida II e são determinados pelas pontes de H estabelecidas entre resíduos de aminoácidos envolvidos na ligação peptídica e, conseqüentemente, pela conformação do esqueleto proteico. A banda correspondente à Amida I, absorção mais intensa proveniente das proteínas, deve-se à vibração angular (*stretching*) dos grupos: C=O (70-85%) e C-N (10-20%) (Bandekar, 1992). No caso das amostras de farinha de sorgo e milho cruas está localizada em torno de  $1640\text{ cm}^{-1}$  (Tabela 4.1). A banda da Amida

II depende da vibração no plano (*bending*) (40-60%) e das vibrações angulares (*stretching*) das ligações C-N (18-40%) e C-C (10%) (Bandekar 1992). Neste caso em particular, a referida banda está localizada em torno de  $1540\text{ cm}^{-1}$ .

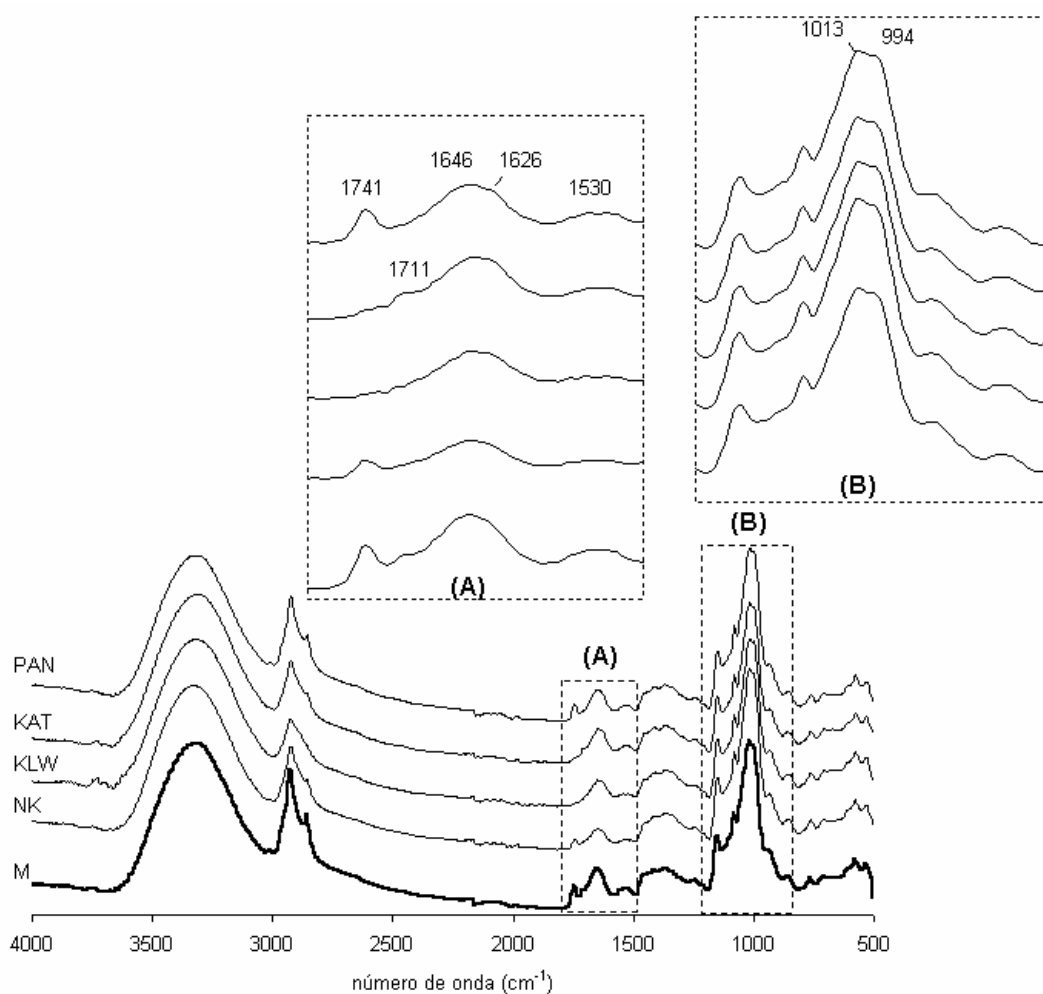
O amido, polissacarídeo maioritário, é responsável pelos sinais presentes na região da *impressão digital*.

Para além destas duas regiões mais relevantes, nos espectros, há outros sinais importantes. Um deles, localizado a  $1741\text{ cm}^{-1}$ , indica a presença de triglicéridos em todas as farinhas analisadas. As intensidades destes picos podem ser associadas aos valores de matéria gorda apresentados na Tabela 3.2. Nas proximidades deste sinal pode ser detectado, em algumas variedades de sorgo (KLW e PAN 8564), um outro sinal a  $1711\text{ cm}^{-1}$ . Este sinal pode ser atribuído à presença de ácidos gordos. Contudo, também podem corresponder à presença de fracções específicas de compostos fenólicos (Bueno 1989).

Uma análise directa aos espectros de FT-IR não permite uma adequada discriminação entre as variedades de farinha estudadas.

#### 4.3.1.2 Amostras cozidas

Os espectros referentes às amostras de farinha cozida estão apresentadas na Figura 4.2. O aspecto global destes espectros é bastante similar ao aspecto dos espectros das farinhas cruas. No entanto, uma análise mais cuidada à região de absorção das proteínas (Figura 4.2 A) evidencia alterações relativas à localização das bandas correspondentes à Amida I e Amida II. No que diz respeito à Amida I, apenas nos espectros de amostras de sorgo, surge um ombro a  $1630\text{ cm}^{-1}$ . Este ombro não está presente nos espectros de farinha de milho. Em relação à Amida II verifica-se uma ligeira deslocação da posição do máximo da banda e surge um novo pico a  $1519\text{ cm}^{-1}$  (Tabela 4.1).



**Figura 4.2:** Espectros de FT-IR de amostras de farinha de milho e sorgo cozidas. **(A)** Expansão correspondente à região espectral das proteínas ( $1800\text{--}1450\text{ cm}^{-1}$ ) e **(B)** expansão da região espectral correspondente à região do amido ( $1200\text{--}800\text{ cm}^{-1}$ ).

Os sinais correspondentes às Amidas I e II são extremamente sensíveis à conformação da proteína e pode então afirmar-se que o cozimento induz alteração estrutural deste constituinte da farinha. De acordo com estes resultados pode afirmar-se que a conformação proteica predominante na farinha crua é a  $\alpha$ -hélice, o que está de acordo com Duodu *et al.* (2001).

**Tabela 4.1:** Alterações ocorridas nos sinais correspondentes às Amidas I e II com o cozimento (número de onda em  $\text{cm}^{-1}$ ).

<b>Amostras cruas</b>	<b>Milho</b>	<b>NK283</b>	<b>KLW</b>	<b>KAT369</b>	<b>PAN8564</b>
Amida I	1643	1646	1643	1643	1646
Amida II	1546	1542	1543	1539	1540
<b>Amostras cozidas</b>	<b>Milho</b>	<b>NK283</b>	<b>KLW</b>	<b>KAT369</b>	<b>PAN8564</b>
Amida I	1647	1646; 1633	1646; 1635	1647; 1631	1646; 1630
Amida II	1538; 1519	1538; 1519	1539; 1519	1539; 1519	1539; 1519

Quando as amostras são submetidas a cozimento com água, como ocorre no caso de um cozimento para produção de uma papa para consumo, para além de uma conformação em  $\alpha$ -hélice pode verificar-se a existência de uma conformação intramolecular em folha  $\beta$  antiparalela. No caso do milho, esta alteração estrutural a nível das proteínas parece ser menos sentida.

Estes resultados são coerentes com outros publicados por Duodu *et al.* (2001).

No que diz respeito à região correspondente à absorção do amido, pode verificar-se que o cozimento induz alterações nos picos a 1013 e 994  $\text{cm}^{-1}$ . Ambos os picos são incrementados com o cozimento, estas alterações são indicadoras da presença de amido gelatinizado no sistema (Nunes *et al.* 1997).

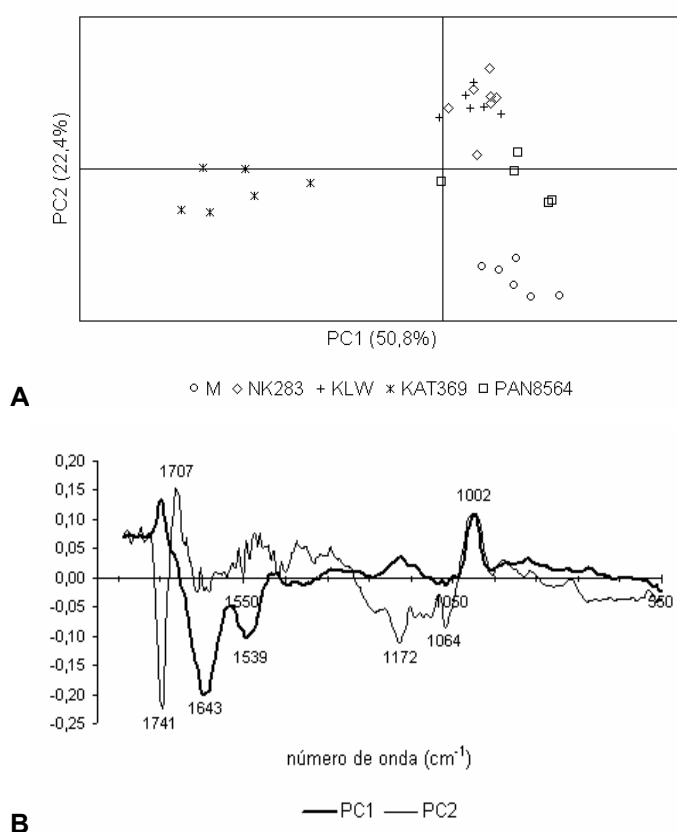
Com o cozimento não se verificam alterações no pico a 1741  $\text{cm}^{-1}$ , portanto, uma análise directa aos espectros de FT-IR não permitem detectar alterações na fracção de triglicéridos das farinhas. No que diz respeito ao pico de 1711  $\text{cm}^{-1}$ , não há alterações significativas.

Os espectros foram, então, submetidos a análise multivariada de forma a tentar caracterizar as diversas variedades de farinha estudadas, assim como estabelecer alterações ocorridas com o cozimento.

## 4.3.2 Análise dos espectros de FT-IR por PCA

### 4.3.2.1 Amostras cruas

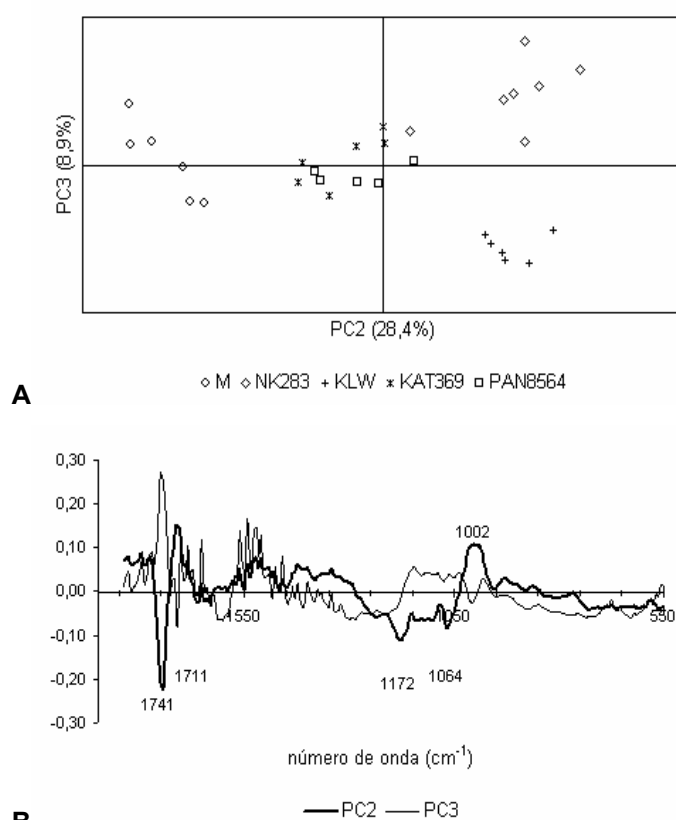
Após diversos ensaios preliminares verificou-se que para a análise por componentes principais a região  $1834\text{--}505\text{ cm}^{-1}$  seria a mais adequada.



**Figura 4.3:** (A) Diagrama de coordenadas factoriais de PC1 vs PC2 e (B) diagrama das contribuições factoriais do PC1 e PC2 referentes aos espectros de FT-IR de amostras de farinha crua. Espectros analisados na sub-região  $1834\text{--}505\text{ cm}^{-1}$ .

O diagrama das coordenadas factoriais (PC1 vs. PC2), referente às amostras de farinha crua, mostra discriminação entre milho, KAT369 e as restantes amostras de farinha estudadas. A variedade de sorgo KAT369 é discriminada pelo eixo PC1 (responsável pela explicação de 50,8% da informação) e fica localizada na sua região negativa. O eixo PC2, explica 22,4% da informação, e é responsável pela discriminação da amostra de

milho, ficando esta amostra localizada na sua região negativa. (Figura 4.3 A). O diagrama das contribuições factoriais mostra que a discriminação através do eixo PC1(-) é baseada na presença de sinais a 1643, 1539  $\text{cm}^{-1}$ . Esses sinais são referentes à proteína, respectivamente à Amida I e II. A discriminação da variedade KAT369 pode ser devida ao seu maior conteúdo proteico. A localização da farinha de milho no eixo PC2(-) é devida, principalmente, ao sinal a 1741  $\text{cm}^{-1}$  que corresponde à presença de compostos com grupo éster, o que está de acordo com o seu maior teor em lípidos, como se pode verificar pela Tabela 3.2 (Figura 4.3 B).



**Figura 4.4:** (A) Diagrama de coordenadas factoriais de PC2 vs PC3 e (B) diagrama das contribuições factoriais do PC2 e PC3 referentes aos espectros de FT-IR de amostras de farinha crua. Espectros analisados na sub-região 1834-505  $\text{cm}^{-1}$ .

Analisando agora uma outra projecção (PC2 vs. PC3), das mesmas amostras, pode verificar-se que o eixo PC2 (responsável pela explicação de 28,4% da informação) é responsável pela discriminação do milho (PC2(-)), NK283 e KLW (PC2(+)). O eixo PC3 (responsável pela explicação de 8,9%

da informação) possibilita a discriminação entre as variedades NK283 e K LW (Figura 4.4 A).

O diagrama das contribuições factoriais mostra, mais uma vez, que a discriminação das amostras de milho na região negativa do eixo PC2 é efectuada devida à presença do sinal espectroscópico a  $1741\text{ cm}^{-1}$ , reflectindo o seu elevado teor em matéria gorda. Evidenciando-se, novamente, uma clara influencia da fracção lipídica na caracterização da farinha de milho.

É também a matéria gorda (sinal a  $1741\text{ cm}^{-1}$ ) a responsável pela discriminação das variedades NK283 e K LW através de eixo PC3. Esta discriminação reflecte o teor em gordura destas amostras.

#### 4.3.2.2 Amostras cozidas

As amostras de farinha cozida, mesmo após serem homogeneizadas novamente, mantiveram um aspecto heterogéneo e, conseqüentemente, a reprodutibilidade dos espectros de infravermelho foi fraca.

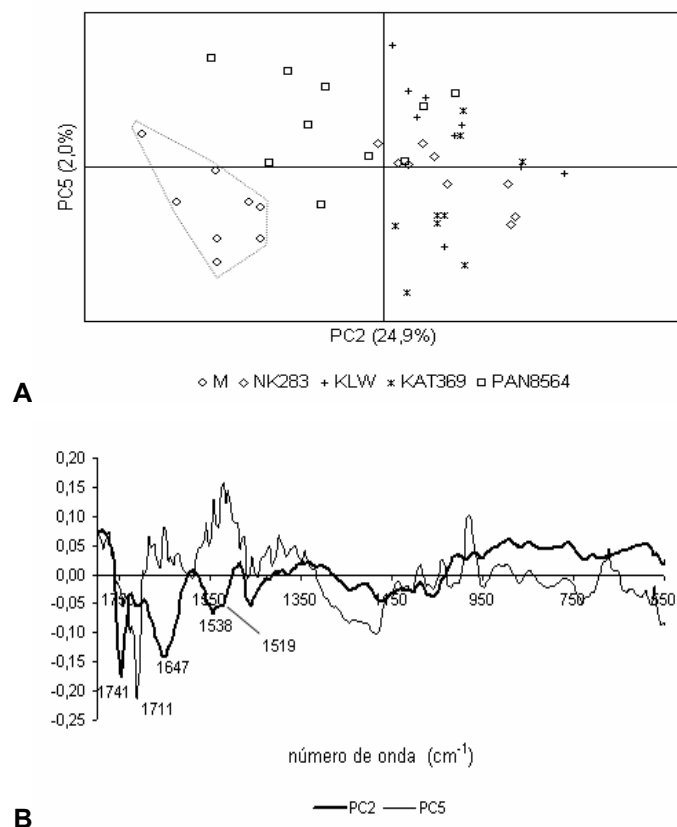
Este efeito é provavelmente devido à perda de cristalinidade do sistema, resultado da gelatinização do amido. Mesmo assim as amostras de farinha cozida foram submetidas a análise em componentes principais.

Na Figura 4.5 A é apresentado o diagrama das coordenadas factoriais PC2 vs. PC5. Pode verificar-se que a discriminação entre amostras de sorgo é inexistente. No entanto, pode verificar-se um certo distanciamento entre as amostras de sorgo e as amostras de milho. Estando estas amostras localizadas no quadrante III, PC2 e PC5 negativos.

Segundo o diagrama das contribuições factoriais a discriminação das amostras de milho é efectuada pelos picos  $1746$  e  $1711\text{ cm}^{-1}$ , estes sinais são atribuídos à presença de triglicéridos e ácidos gordos, respectivamente. A localização da amostra de sorgo PAN, na região PC2 (-) também está relacionada com o seu teor lipídico (sinal a  $1746\text{ cm}^{-1}$ ). Esta amostra, tal como o milho, é rica em matéria gorda.

Ainda em relação à amostra de milho, a sua localização na região mais negativa do eixo PC2, pode dizer-se que é a mais influenciada pelos sinais

1647, 1538 e 1519  $\text{cm}^{-1}$ , atribuídos à absorção das proteínas. As proteínas de milho parecem comportar-se de forma distinta das proteínas das restantes amostras, parecendo ser menos afectadas com o cozimento.



**Figura 4.5:** (A) Diagrama de coordenadas factoriais de PC2 vs PC5 e (B) diagrama das contribuições factoriais do PC2 e PC5 referentes aos espectros de FT-IR de amostras de farinha cozidas. Espectros analisados na sub-região 1834-505  $\text{cm}^{-1}$ .

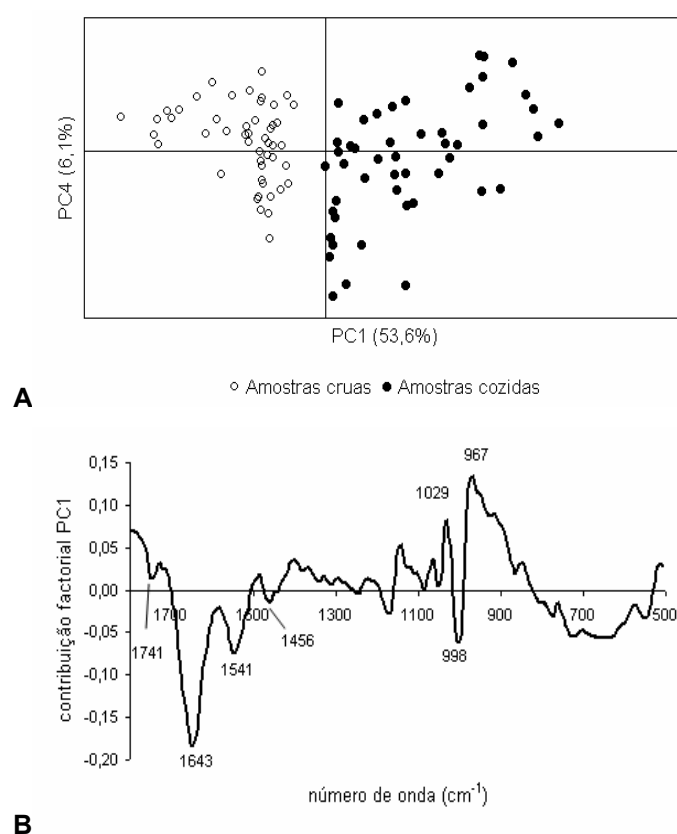
### 4.3.3 Estudo espectroscópico do efeito do cozimento em farinhas

Para o estudo dos espectros de FT-IR das amostras de farinha cruas e cozidas recorrendo a análise por componentes principais utilizou-se a mesma região espectral que no ponto 4.3.2 (1834-505  $\text{cm}^{-1}$ ). Com este estudo pretendeu-se investigar quais os grupos funcionais e consequentemente quais os grupos de compostos da farinha de sorgo e de milho afectados com o cozimento húmido.



Como foi referido anteriormente, os espectros das amostras de farinha cozida apresentavam falta de reprodutibilidade, contudo, um estudo comparativo permite observar algumas alterações consideradas de interesse.

A Figura 4.6 A mostra discriminação entre dois grupos de amostras (cruas e cozidas) através do eixo PC1. As amostras cruas estão localizadas na região negativa do eixo PC1, enquanto que as amostras cozidas estão localizadas na região positiva desse eixo.



**Figura 4.6:** (A) Diagrama de coordenadas factoriais de PC1 vs PC2 e (B) diagrama das contribuições factoriais do PC1 referentes aos espectros de FT-IR de amostras de farinha crua e cozida. Espectros analisados na sub-região  $1834\text{--}505\text{ cm}^{-1}$ .

Pelo perfil correspondente ao PC1 (responsável pela explicação de 53,6% da informação) dos diagramas das contribuições factoriais pode verificar-se que diversos números de onda são responsáveis pela discriminação entre amostras cozidas e cruas:  $1643$ ,  $1541$  e  $998\text{ cm}^{-1}$ . Como seria de esperar, estes comprimentos de onda são indicadores de alterações a nível das proteínas ( $1643$  e  $1541\text{ cm}^{-1}$ ) e do amido ( $998\text{ cm}^{-1}$ ). Pode

detectar-se, também, uma pequena contribuição referente a alterações da fracção lipídica, esta alteração é assinalada pela presença, no perfil correspondente ao PC1, de um sinal a  $1741\text{ cm}^{-1}$  (Figura 4.6 B).

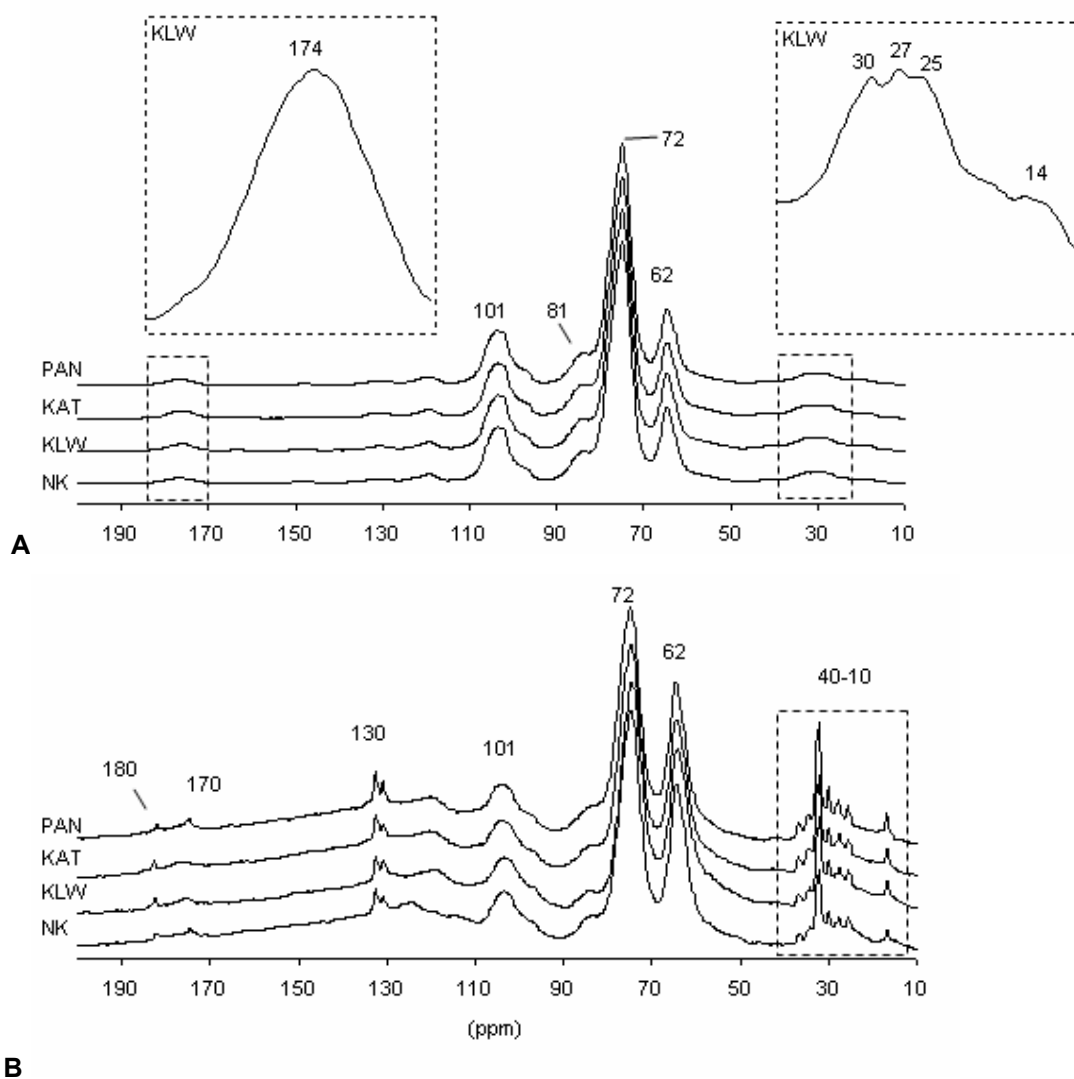
#### 4.3.4 Análise directa de espectros de RMN $^{13}\text{C}$

Na Figura 4.7 estão apresentados os espectros de todas as variedades de sorgo. Uma vez que a variedade de sorgo KWL é a que apresenta maior variabilidade com o cozimento foi estudada em maior detalhe (Capítulo 8). Uma vez que o objectivo principal deste estudo é a determinação de marcadores que nos permitam identificar espectroscopicamente as causas da redução da digestibilidade com o cozimento, pensou-se que seria mais correcto comparar os dois casos extremos – farinha de sorgo cozida com valores de digestibilidade proteica inferiores e farinha de milho cuja digestibilidade não é afectada com o cozimento.

##### 4.3.4.1 Amostras cruas

Os espectros de todas as amostras de farinha de sorgo crua são bastante similares.

Os espectros de CP-MAS  $^{13}\text{C}$  (Figura 4.7 A) mostram a predominância dos sinais correspondentes ao amido (69-110 ppm). São também visualizados no espectro os sinais alifáticos de proteínas e lípidos (10-50 ppm), sinais aromáticos das proteínas (130-160 ppm) e sinais carbonílicos da proteína (pico largo a 170-180 ppm). Devido à mobilidade da fracção lipídica a sua contribuição para este tipo de espectros é mínima.

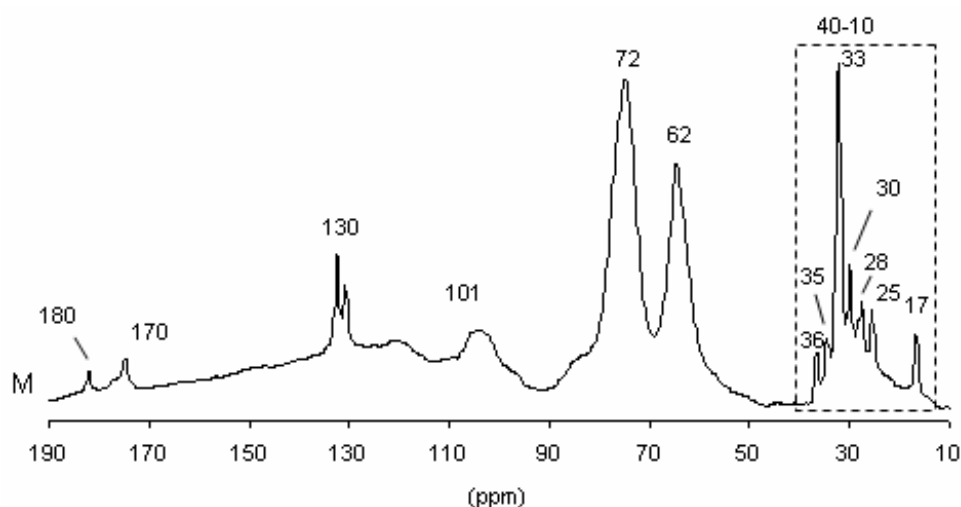
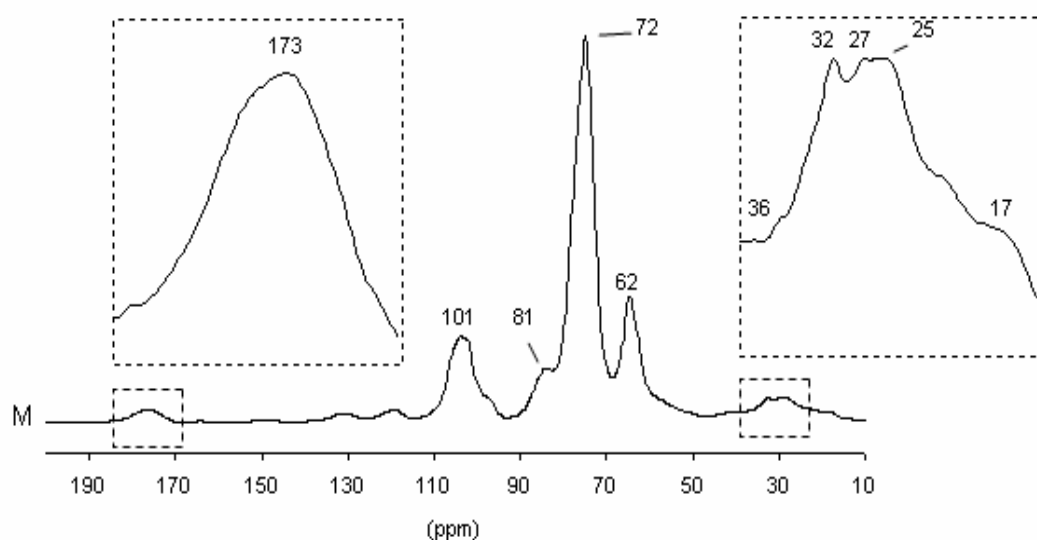


**Figura 4.7:** Espectro de CP-MAS  $^{13}\text{C}$  (A) e de SPE  $^{13}\text{C}$  (B) das amostras de farinha de sorgo crua.

Os espectros de SPE  $^{13}\text{C}$  (Figura 4.7 B) das amostras de sorgo cruas revelam que os lípidos são a fracção com maior mobilidade nas amostras cruas. Esses compostos apresentam inúmeros ambientes alifáticos com ressonâncias de 10 o 40 ppm e é detectado, também, algum grau de insaturação (130 ppm correspondente a  $\text{C}=\text{C}$ ) e ainda dois ambientes  $\text{C}=\text{O}$  distintos, um a 180 ppm (ácidos) e outro a 170 ppm (ésteres). As amostras KAT369 e KLV parecem apresentar, na sua composição, maior teor de ácidos móveis.

Em relação ao amido, a sua presença é apenas detectada pela existência de um sinal a 72 ppm, referente ao C6 (grupo CH<sub>2</sub>OH) e um outro a 62 ppm, correspondentes ao C dos anéis.

**A**



**B**

**Figura 4.8:** Espectro de CP-MAS <sup>13</sup>C **(A)** e de SPE <sup>13</sup>C **(B)** da amostra de farinha de milho crua.

O espectro de SPE <sup>13</sup>C da amostra de milho cru é muito similar aos espectros das farinhas de sorgo cruas, tanto no que diz respeito à localização como forma dos sinais. No entanto, a mobilidade global dos lípidos parece

ser superior. Esta maior mobilidade poderia estar relacionada com o maior teor lipídico da farinha de sorgo. No entanto, o espectro da farinha de sorgo PAN 8564, também rica em matéria gorda, a mobilidade não parece estar incrementada.

O sinal referente à presença de ésteres (170 ppm) parece ser mais intenso no espectro de SPE  $^{13}\text{C}$  do milho.

De forma a identificar mais facilmente as atribuições referentes aos sinais dos constituintes das farinhas, na Tabela 4.2 essas mesmas atribuições são efectuadas para sinais correspondentes aos espectros de CP-MAS  $^{13}\text{C}$  e SPE  $^{13}\text{C}$  de milho e de sorgo K LW cru.

**Tabela 4.2:** Atribuições dos sinais dos espectros de CP-MAS  $^{13}\text{C}$  e SPE  $^{13}\text{C}$  (valores em ppm).

CP/MAS <sup>13</sup> C		SPE <sup>13</sup> C	
Milho			
173	C=O proteínas	180	C=O (ácido) lípidos
101	amido (C1)	170	C=O (éster) lípidos
81	amido (C4)	130	C=C lípidos
72	CH <sub>2</sub> OH (C6)	101	amido (C1)
62	amido (C anel)	72	CH <sub>2</sub> OH (C6)
40-10	proteína alifática + lípidos	62	amido (C anel)
		0-40	lípidos alifáticos
Sorgo K LW			
174	C=O proteínas	180	C=O (ácido) lípidos
101	amido (C1)	170	C=O (éster) lípidos
82	amido (C4)	130	C=C lípidos
72	CH <sub>2</sub> OH (C6)	101	amido (C1)
60	amido (C anel)	72	CH <sub>2</sub> OH (C6)
40-10	proteína alifática + lípidos	62	amido (C anel)
		0-40	lípidos alifáticos

#### 4.3.4.2 Amostras cozidas

Como foi referido na secção 4.3.1, foram identificados por FT-IR os compostos da farinha mais afectados pelo cozimento: amido, proteína e lípidos. Os resultados de RMN de estado sólido confirmam essas alterações estruturais e complementam a informação acerca deste tópico.

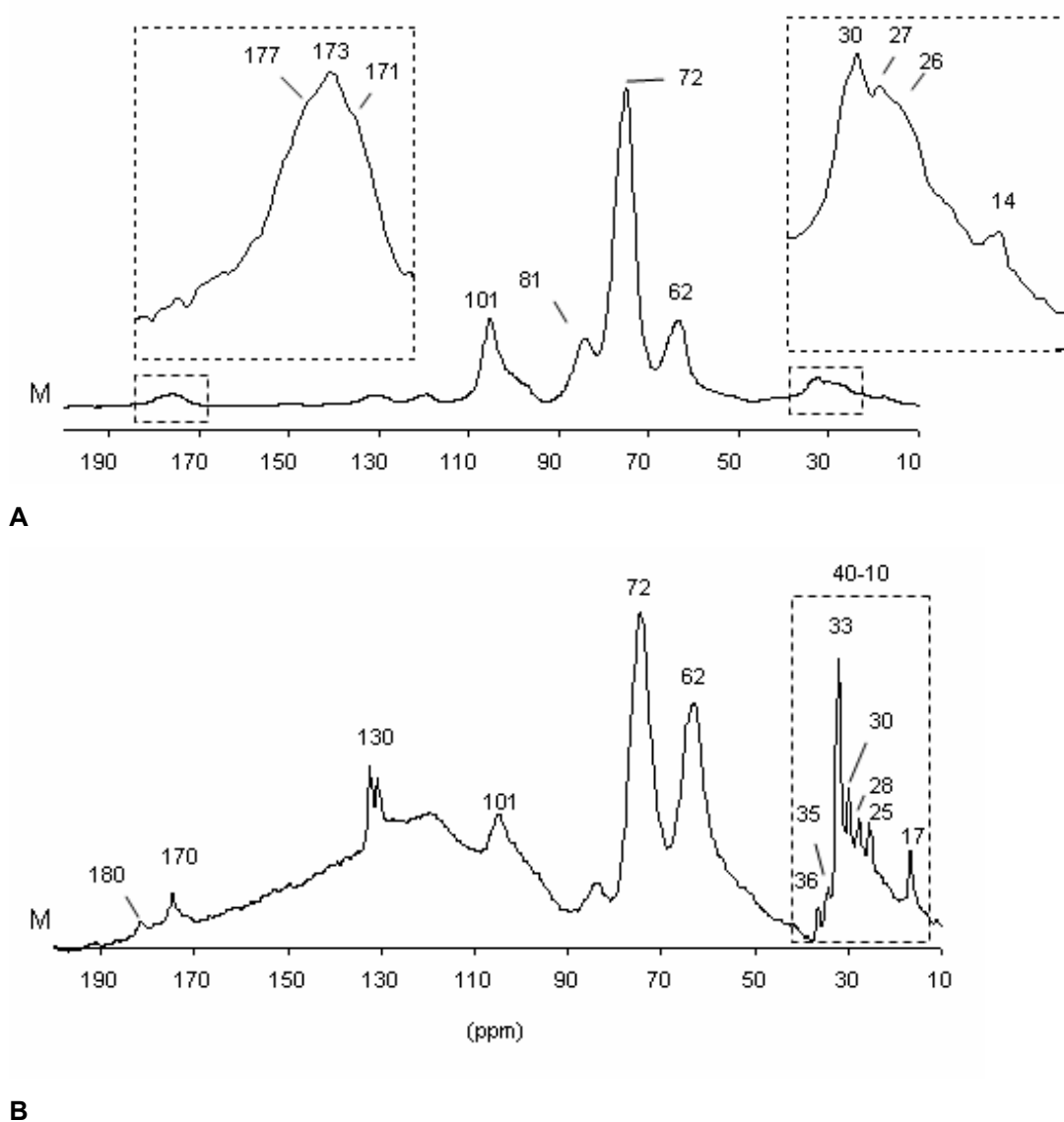
No que diz respeito ao amido, os espectros de CP-MAS  $^{13}\text{C}$  (Figura 4.9 A) da amostra de milho mostram que o cozimento induz um incremento da resolução dos sinais do C4 (81 ppm) e C1 (101-102 ppm). Então, o cozimento induz alterações conformacionais envolvendo as ligações  $\alpha(1-4)$  da cadeia principal. Nota-se também um alargamento do sinal a 72 ppm (C6), esta alteração está relacionada com um aumento da desordem a nível de grupos  $\text{CH}_2\text{OH}$  grupos e/ou inter-cruzamentos  $\alpha(1-6)$ .

No milho, no carbono carbonílico das proteínas nota-se o aparecimento de ombros a 177 e 171 ppm. Os sinais localizados nesta região espectral estão relacionados com a estrutura da proteína, logo, alterações verificadas nesta região são indicadoras de alterações estruturais.

Segundo Paulis *et al.* (1979), as prolaminas são a fracção proteica mais abundante no sorgo, conseqüentemente, a sua composição em aminoácidos é representativa da composição de aminoácidos da farinha. Uma vez que os resíduos de glutamina (Gln) e de prolina (Pro) são os mais abundantes, essas alterações estruturais podem ser interpretadas comparando-as com alterações estruturais previamente estudadas em polipeptídeos sólidos ou farinhas de natureza distinta. Assim sendo, o aparecimento do ombro a 177 ppm pode ser indicador de um incremento da conformação em volta  $\beta$  da Gln. O ombro a 171 ppm pode ser mais indicador de aumento de conformações tipo I e tipo II, em torno do resíduo Pro (171,5 e 170,3 ppm) do que de incremento de conformação em volta  $\beta$  (174,2 ppm) (Gil *et al.* 1997).

Relativamente à região alifática, onde surgem sinais tanto de proteínas como de lípidos, a atribuição é muito difícil de efectuar devido à sobreposição de sinais. Nesta região, as alterações induzidas pelo cozimento são similares

no milho e no sorgo, é de salientar o incremento do pico a 30 ppm. Este incremento sugere que parte dos lípidos param a ter mobilidade reduzida.

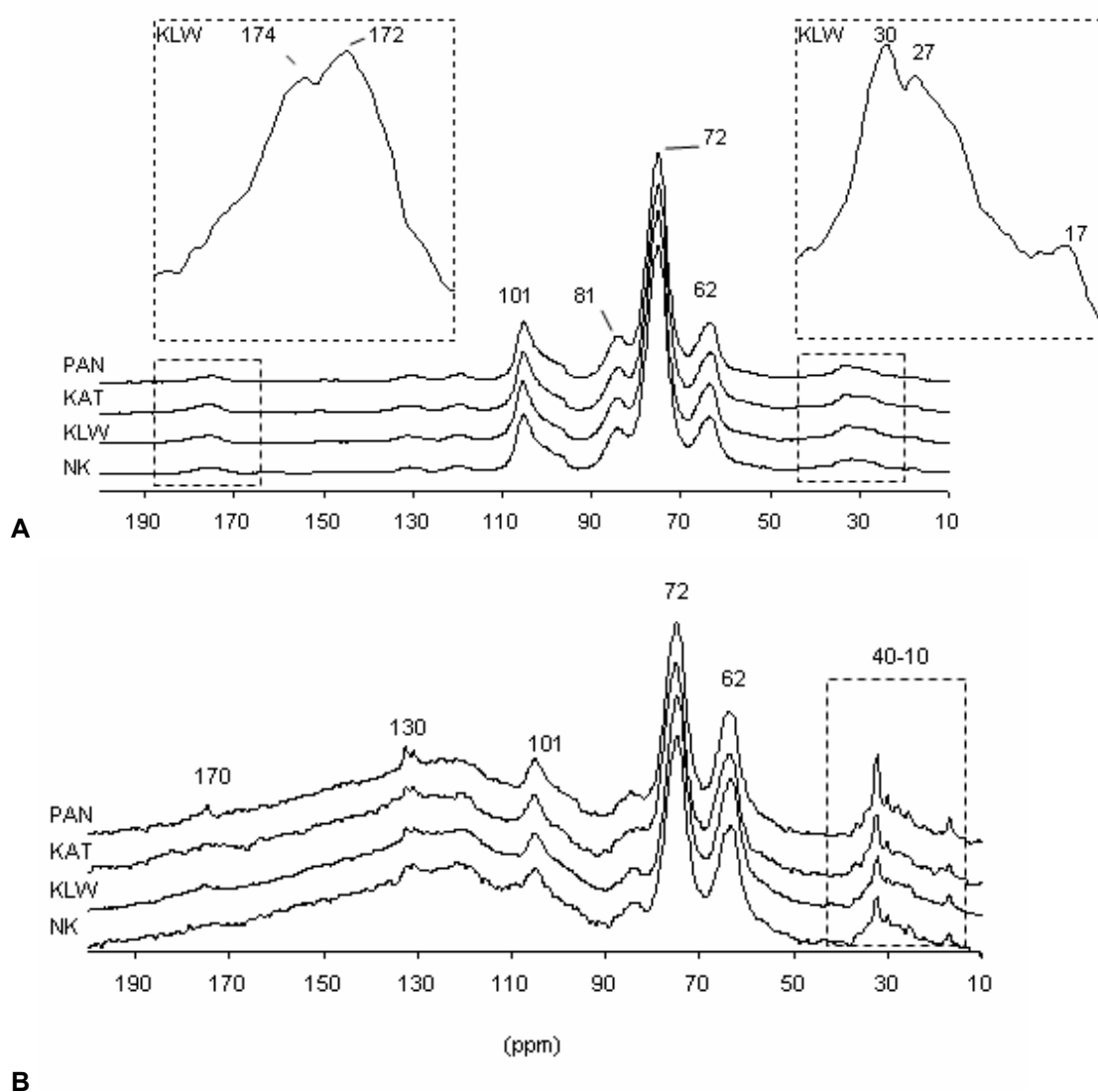


**Figura 4.9:** Espectro de CP-MAS  $^{13}\text{C}$  **(A)** e de SPE  $^{13}\text{C}$  **(B)** de farinha de milho cozida.

O espectro de SPE  $^{13}\text{C}$  da farinha de milho cozida é apresentado na Figura 4.9 B. Neste espectro nota-se claramente a elevada mobilidade da fracção lipídica. A região alifática torna-se mais afilada após o cozimento e a mobilidade da fracção lipídica do milho não diminui significativamente com o cozimento. O sinal a 180 ppm (C=O) diminui, um pouco, com o cozimento, denotando uma ligeira redução da mobilidade dos ácidos.

Os espectros de CP-MAS  $^{13}\text{C}$  das amostras de sorgo cozido, e no que diz respeito à região do espectro correspondente ao amido. o comportamento é em tudo semelhante ao do milho, podendo afirmar-se que o comportamento deste componente face ao cozimento é similar em ambas as variedades.

No que diz respeito à região espectral das proteínas as alterações são um pouco distintas quando comparadas com as do milho. O sinal a 172 ppm torna-se mais resolvido, sugerindo uma predominância da conformação tipo I e tipo II em torno da prolina. A ausência do ombro a 177 ppm (que surgia no espectro do milho) indica menor conformação volta  $\beta$  da glutamina.



**Figura 4.10:** Espectro de CP-MAS  $^{13}\text{C}$  (A) e de SPE  $^{13}\text{C}$  (B) das farinhas de sorgo cozidas.



Os espectros de SPE  $^{13}\text{C}$  indicam que a fracção lipídica comporta-se de forma distinta no milho e no sorgo. O cozimento induz simultaneamente uma diminuição e um alargamento dos sinais, referentes aos lípidos, em todas as variedades de sorgo. Pode verificar-se que os sinais a 180 ppm desaparecem e sinais a 170 e 130 ppm diminuem acentuadamente (Figura 4.10 B).

Uma vez que a preparação da amostra: cozimento, liofilização e homogeneização foi desenvolvida de forma que não houvesse perdas de matéria, pode afirmar-se que o cozimento provoca uma alteração evidente na mobilidade da fracção lipídica do sorgo. Estes resultados sugerem que os lípidos podem ter sido *imobilizados* quer pelas proteínas quer pelo amido. Os ácidos gordos (com sinal a 180 ppm) parecem ser os mais afectados. Morrison (1978) verificou que, quando ocorre dilatação do amido, durante a gelatinização, podem ser retidos lípidos (em particular ácidos gordos livres). Juntamente com os lípidos podem também ficar, complexadas, algumas proteínas (Taha e Mohamed, 2004).

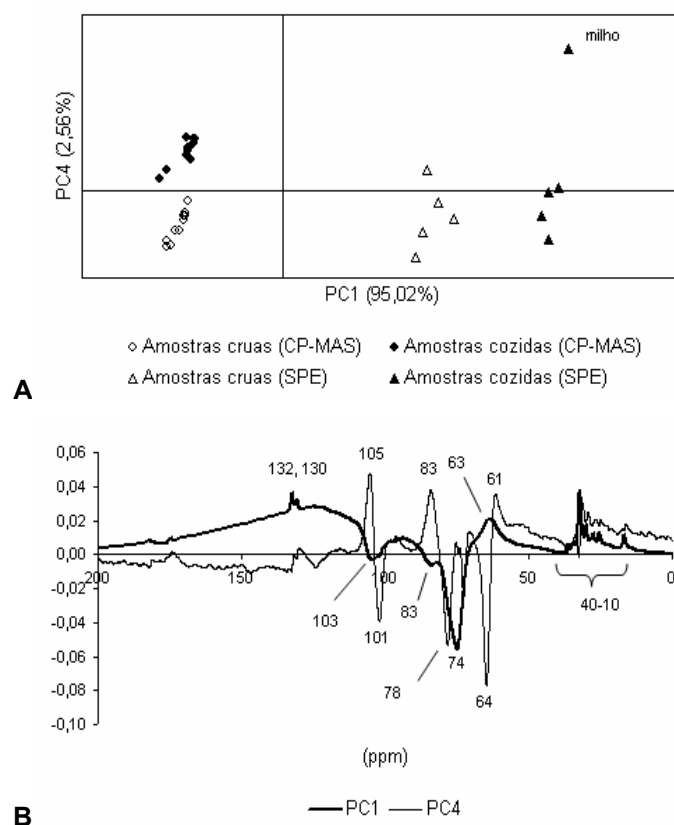
No Capítulo 10 é apresentado um estudo de digestibilidade *in vitro* aplicado a amostras de sorgo e de milho previamente desengorduradas. Esse estudo revelou que, no sorgo, os valores de digestibilidade proteica são incrementados quando os lípidos são removidos das amostras de farinha antes do cozimento.

#### 4.3.5 Análise dos espectros de RMN $^{13}\text{C}$ por PCA

Todos os espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  adquiridos foram submetidos a análise multivariada exploratória por PCA.

Quando os espectros de CP-MAS  $^{13}\text{C}$  e SPE  $^{13}\text{C}$  são analisados em conjunto, como seria de esperar verifica-se uma discriminação entre espectros de CP-MAS e de SPE (Figura 4.11 A). Essa discriminação ocorre através do eixo PC1 (responsável pela explicação de 95,02% da informação) e, como se pode verificar na Figura 4.11 B, é devida aos sinais a 103, 83 e 74 ppm, no caso dos espectros CP-MAS  $^{13}\text{C}$ , e aos sinais a 132, 130, 63 e 40-10 ppm, no caso dos espectros de SPE  $^{13}\text{C}$ . As ressonâncias que discriminam os espectros CP-MAS  $^{13}\text{C}$  estão relacionadas com os carbonos rígidos

enquanto que as que discriminam os espectros de SPE  $^{13}\text{C}$  estão associadas à presença de componentes mais móveis, principalmente à fracção lipídica. Desta forma, através do diagrama das contribuições factoriais do PC1 é confirmada a grande influência da mobilidade lipídica nos espectros de SPE  $^{13}\text{C}$ .

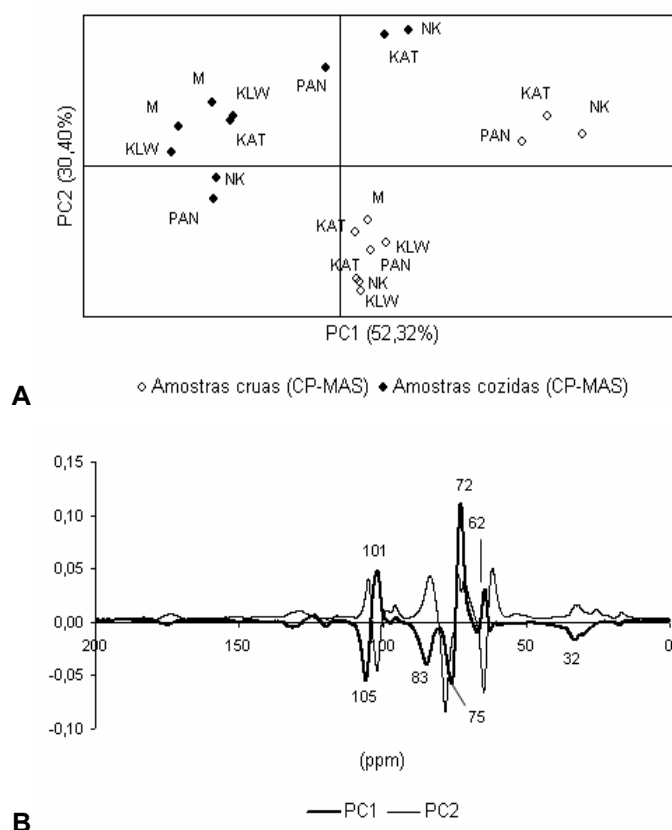


**Figura 4.11: (A)** Diagrama de coordenadas factoriais de PC1 vs PC4 e **(B)** diagrama das contribuições factoriais do PC1 e PC4 referentes aos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  das amostras de farinha crua e cozida de todas as variedades de farinha. Espectros analisados na sub-região 0-200 ppm.

Em ambos os grupos de espectros pode distinguir-se dois sub-grupos correspondentes às amostras cruas e cozidas. Em relação aos espectros de CP-MAS  $^{13}\text{C}$ , essa discriminação é obtida através do eixo PC4 (Figura 4.11 A). No diagrama das coordenadas factoriais pode verificar-se que o amido é o grande responsável pela discriminação entre os dois grupos de espectros (Figura 4.11 B). As alterações estruturais do amido com o cozimento são desta forma confirmadas.

A única amostra que está localizada no quadrante I é o espectro de SPE  $^{13}\text{C}$  do milho cozido (Figura 4.11 A). Esta variedade de farinha comporta-se de forma distinta das restantes no que diz respeito ao cozimento em água. Como foi referido anteriormente, durante o cozimento a fracção lipídica do milho não se torna mais rígida, contrariamente ao que ocorre relativamente às amostras de sorgo.

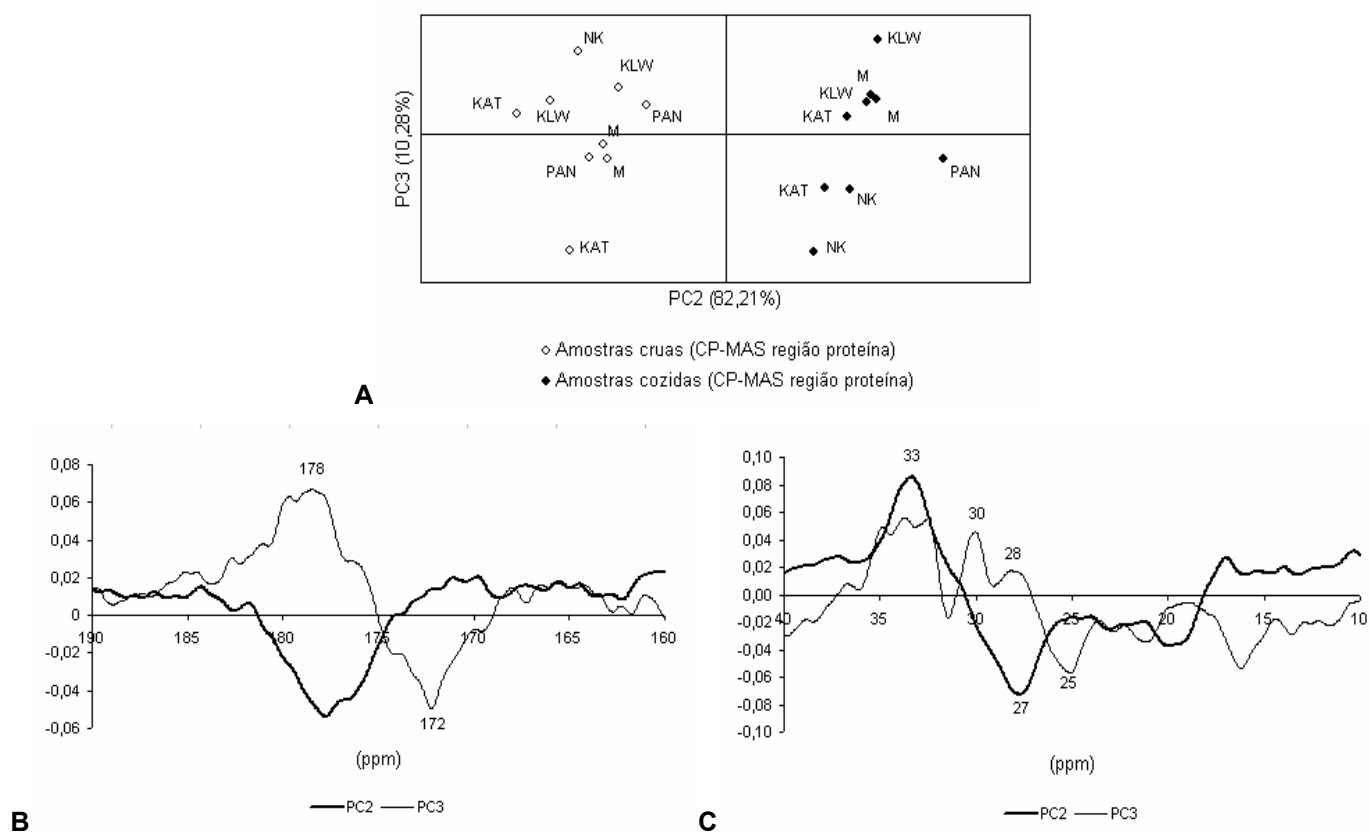
Se os espectros de CP-MAS  $^{13}\text{C}$  forem analisados separados dos de SPE  $^{13}\text{C}$  pode verificar-se uma discriminação entre amostras cruas e cozidas. Apesar de uma dispersão das amostras no diagrama das coordenadas factoriais pode verificar-se que a discriminação é feita através do eixo PC1, este eixo é responsável pela explicação de 52,32% da informação. Na região negativa estão localizadas as amostras cozidas enquanto que as cruas estão localizadas na região positiva do PC1 (Figura 4.12 A).



**Figura 4.12: (A)** Diagrama de coordenadas factoriais de PC1 vs PC2 e **(B)** diagrama das contribuições factoriais do PC1 e PC2 referentes aos espectros de RMN CP-MAS  $^{13}\text{C}$  das amostras de farinha crua e cozida de todas as variedades de farinha. Espectros analisados na sub-região 0-200 ppm.

De acordo com o diagrama das contribuições factoriais a distinção entre esses grupos de amostras é devida a sinais correspondentes ao amido. Esse diagrama mostra, também, uma pequena influência da proteína (regiões: 190-160 ppm e 40-10 ppm), esta influência pode ser traduzida em alterações estruturais na proteína (Figura 4.12 B).

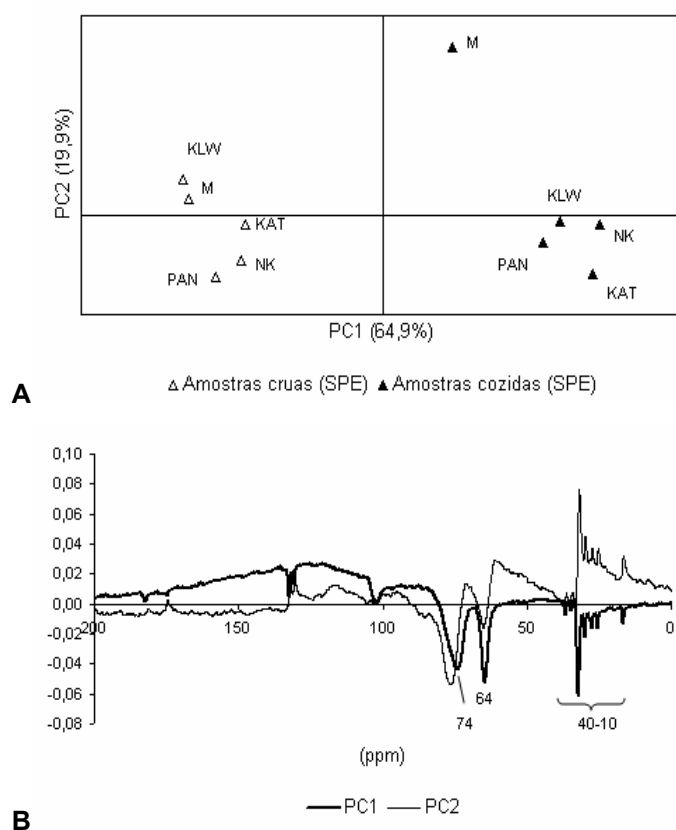
De modo a investigar a influência do cozimento nas proteínas a região correspondente à ressonância desses constituintes da farinha foi analisada separadamente. Os resultados da aplicação de PCA às regiões 190-160 ppm e 40-10 ppm são apresentados na Figura 4.13. O diagrama das coordenadas factoriais PC2 vs. PC3 mostra distinção entre amostras cruas e cozidas (Figura 4.13 A).



**Figura 4.13: (A)** Diagrama de coordenadas factoriais de PC2 vs PC3 e **(B)** diagrama das contribuições factoriais do PC2 e PC3 referentes aos espectros de RMN CP-MAS <sup>13</sup>C das amostras de farinha crua e cozida de todas as variedades de farinha. Espectros analisados na sub-região 160-190 ppm e 40-10 ppm.

As amostras cozidas, localizadas na região PC2 (+), são caracterizadas por um sinal a 33 ppm e as amostras cruas, localizadas na região PC2 (-), são caracterizadas por sinais a 178 e 27 ppm (Figura 4.13 B). Pode afirmar-se que a estrutura das proteínas é alterada com o cozimento e os sinais a 178 e 27 ppm, característicos da proteína da farinha crua, dão lugar a outro sinal que passa a caracterizar a farinha cozida – 33 ppm.

Este sinal a 33 ppm é característico dos espectros de SPE  $^{13}\text{C}$  das amostras e tem vindo a ser associado à presença de lípidos móveis. A sua presença na caracterização dos espectros de CP-MAS  $^{13}\text{C}$  das amostras cozidas poderá evidenciar a imobilização dos lípidos aquando do cozimento das farinhas.



**Figura 4.14:** (A) Diagrama de coordenadas factoriais de PC1 vs PC2 e (B) diagrama das contribuições factoriais do PC1 e PC2 referentes aos espectros de RMN SPE  $^{13}\text{C}$  das amostras de farinha crua e cozida de todas as variedades de farinha. Espectros analisados na sub-região 200-0 ppm.

Os espectros de SPE  $^{13}\text{C}$  também foram analisados separadamente. A discriminação entre amostras cruas e cozidas foi conseguida através do diagrama das coordenadas factoriais PC1 vs. PC2 (Figura 4.14 A). A região espectral correspondente aos lípidos (40-10 ppm) é responsável pela discriminação da amostra de milho cozida, localizada no quadrante I. Mais uma vez, a influência da mobilidade lipídica é evidenciada. Esta amostra apresenta comportamento distinto relativamente às amostras de sorgo, segundo o diagrama das contribuições factoriais, essa discriminação assenta nos sinais correspondentes à fracção lipídica (Figura 4.14 B).

#### 4.3.6 Análise dos espectros de FT-IR e RMN $^{13}\text{C}$

Para uma melhor compreensão das fontes de variabilidade que caracterizam os sistemas empregaram-se ferramentas quimiométricas que possibilitam a comparação de dois ou mais domínios para a extracção de informação complementar. Uma dessas técnicas é a OPA (*Outer Product Analysis* - análise de produtos externos) (Rutledge *et al.* 2001).

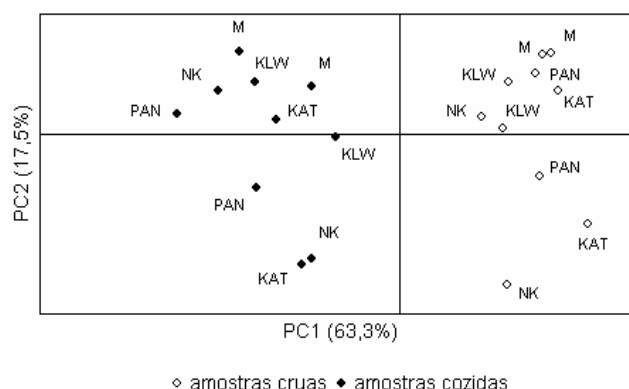
Esta abordagem, permite deduzir vantagens da sinergia entre as principais características de um domínio relativamente a outro. Um exemplo particular desta abordagem é a utilização da RMN para caracterizar fontes de variabilidade no FT-IR.

Neste caso em particular, esta ferramenta quimiométrica foi empregue para combinar informação contida nos sinais de FT-IR e de CP-MAS  $^{13}\text{C}$  (FT-IR e CP-MAS  $^{13}\text{C}$ ), assim como para combinar informação contida nos sinais de FT-IR e de SPE  $^{13}\text{C}$  (FT-IR e SPE  $^{13}\text{C}$ ).

##### 4.3.6.1 FT-IR e CP-MAS $^{13}\text{C}$

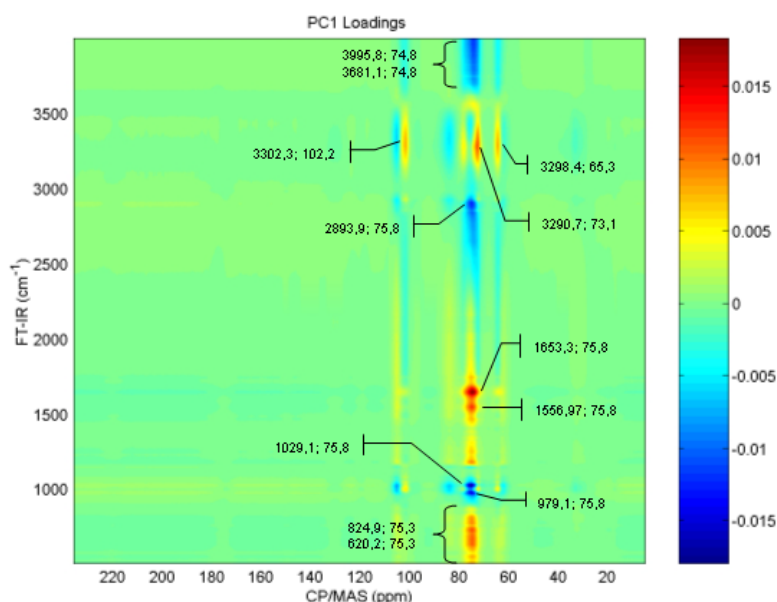
Através do diagrama das coordenadas factoriais obtido através da OPA aplicada aos sinais de FT-IR e CP-MAS  $^{13}\text{C}$  pode verificar-se que o eixo PC1 (responsável pela explicação de 63,3% da informação) separa as amostras em dois grupos: na região do PC1 (+) estão localizadas as amostras cruas,

enquanto que no PC1 (-) estão localizadas as amostras cozidas (Figura 4.15).



**Figura 4.15:** Diagrama de coordenadas factoriais de PC1 vs PC2 referente à combinação dos domínios de FT-IR e CP-MAS  $^{13}\text{C}$ . Amostras de farinha crua e cozida de todas as variedades de farinha.

A Figura 4.16 confere informação acerca de quais as relações FT-IR / CP-MAS  $^{13}\text{C}$  ( $\text{cm}^{-1}/\text{ppm}$ ) são responsáveis pelas discriminações referidas anteriormente.



**Figura 4.16:** Superfície de contribuições factoriais do PC1 referentes à combinação dos domínios de FT-IR e CP-MAS  $^{13}\text{C}$ . Amostras de farinha crua e cozida de todas as variedades de farinha.

**Tabela 4.3:** Atribuições das correlações FT-IR  $\Theta$  CP-MAS  $^{13}\text{C}$  apresentadas nas superfícies de correlação PC1 e PC2 referentes às amostras de farinhas cruas e cozidas.

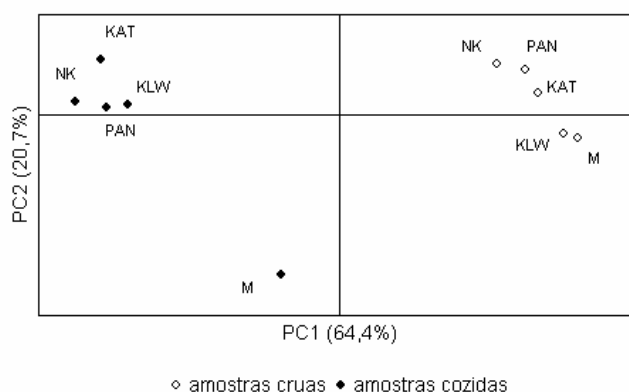
FT-IR; CP-MAS $^{13}\text{C}$ (cm $^{-1}$ ;ppm)	Atribuições
<b>PC1 (+)</b>	
3302,3; 102,2	O-H/N-H; amido C1
3290,7; 73,1	O-H/N-H; amido C anel
3298,2; 65,3	O-H/N-H; amido
1653,3; 75,8	proteína (amida I); amido
1556,97; 75,8	proteína (amida II); amido
824,9; 75,3	amido; amido
620,2; 75,3	proteína (amida V); amido

Os pares 1653  $\text{cm}^{-1}$  vs. 75,8 ppm e 1556  $\text{cm}^{-1}$  vs. 75,8 ppm correlacionam o amido com as proteínas e poderão ser indicadores de alterações estruturais sentidas pelo amido e pelas proteínas aquando do cozimento.

#### 4.3.6.2 FT-IR $\Theta$ SPE $^{13}\text{C}$

Através do diagrama das coordenadas factoriais obtido através da OPA aplicada aos sinais de FT-IR e SPE  $^{13}\text{C}$  pode verificar-se que o eixo PC1, responsável pela explicação de 64,4% da informação, separa as amostras em dois grupos: na região do PC1 (+) estão localizadas as amostras cruas, enquanto que no PC1 (-) estão localizadas as amostras cozidas. O eixo PC2 é responsável pela discriminação de uma única amostra – farinha de milho cozida (Figura 4.17).

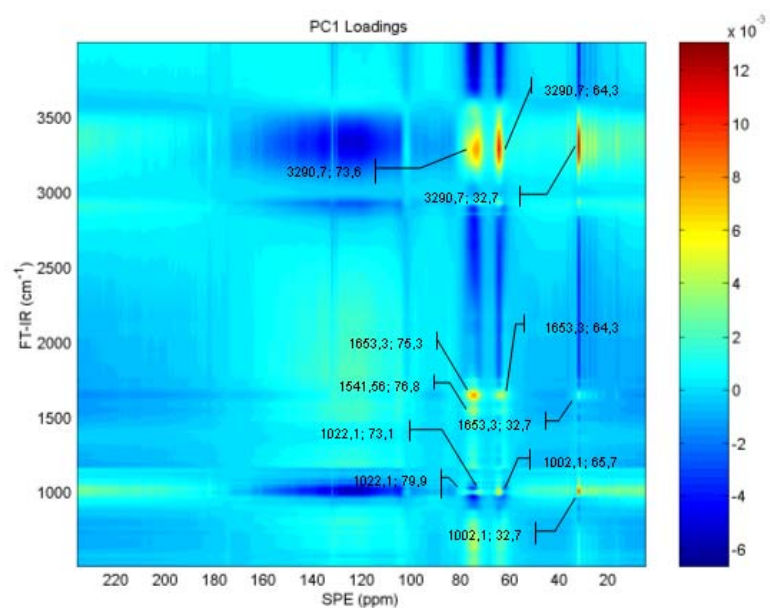




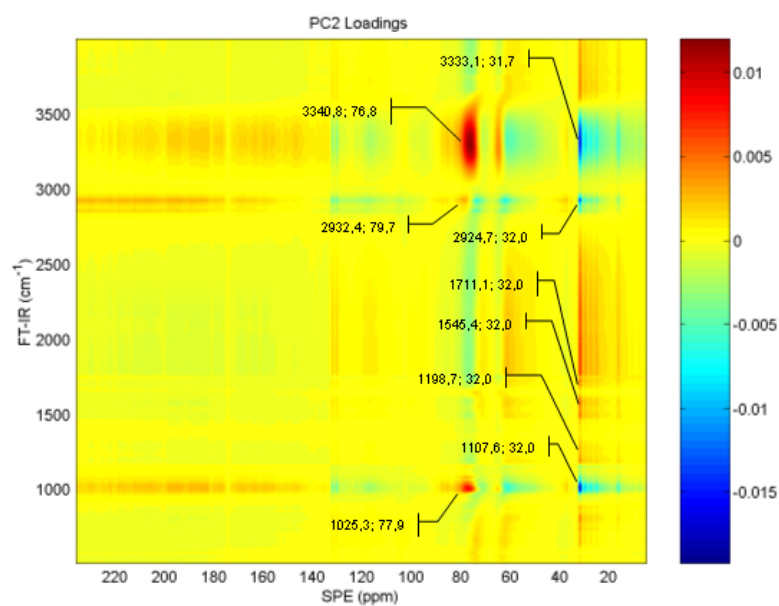
**Figura 4.17:** Diagrama de coordenadas factoriais de PC1 vs PC2 referente à combinação dos domínios de FT-IR e SPE  $^{13}\text{C}$ . Amostras de farinha crua e cozida de todas as variedades de farinha.

As Figura 4.16 A e B conferem informação acerca de quais as relações FT-IR / SPE  $^{13}\text{C}$  ( $\text{cm}^{-1}/\text{ppm}$ ) são responsáveis pelas discriminações referidas anteriormente. Então, de acordo com a superfície de contribuições factoriais referentes ao PC1, as amostras de farinha crua estão correlacionadas positivamente com os seguintes pares ordenados: 3290,7 vs. 73,6; 3290,7 vs. 64,3; 3290,7 vs. 32,7; 1653,3 vs. 75,3; 1653,3 vs. 64,3; 1541,56 vs. 76,8; 1002,1 vs. 79,9; 1002,1 vs. 65,7 e 1002,1 vs. 32,7 (Figura 4.18 A). As possíveis interpretações destas correlações estão apresentadas na Tabela 4.3.

A amostra de milho cozida, localizada no eixo PC2 (-), é caracterizada por correlações entre  $1107\text{ cm}^{-1}$  (FT-IR) e 31,7 ppm do domínio SPE  $^{13}\text{C}$  (Figura 4.18 B). Os sinais de ambos os domínios sugerem uma correlação entre os lípidos móveis e o amido apenas neste tipo de amostra. Correlações entre  $3333\text{ cm}^{-1}$  vs. 31,7 ppm e  $2924\text{ cm}^{-1}$  vs. 31,7 ppm também são reveladoras da importância dos lípidos móveis para a caracterização das amostras de milho cozido.



**A**



**B**

**Figura 4.18:** Superfície de contribuições fatoriais do PC1 **(A)** e PC2 **(B)** referentes à combinação dos domínios de FT-IR e SPE <sup>13</sup>C. Amostras de farinha crua e cozida de todas as variedades de farinha.

**Tabela 4.4:** Atribuições das correlações FT-IR  $\Theta$  SPE  $^{13}\text{C}$  apresentadas nas superfícies de correlação PC1 e PC2 referentes às amostras de farinhas cruas e cozidas.

FT-IR;SPE $^{13}\text{C}$ ( $\text{cm}^{-1}$ ;ppm)	Atribuições	FT-IR;SPE $^{13}\text{C}$ ( $\text{cm}^{-1}$ ;ppm)	Atribuições
<b>PC1 (+)</b>		<b>PC2 (+)</b>	
3290,7; 73,6	O-H/N-H; amido	3340,8; 76,8	O-H; amido
3290,7; 64,3	O-H/N-H; amido	2932,4; 74,7	C-H; amido
3290,7; 32,7	O-H/N-H; proteína/lípidos alifáticos	1025,3; 77,7	amido; amido
1653,3; 75,3	proteína; amido	1198,7; 32,0	amido; proteína
1653,3; 64,3	proteína; amido	1545,4; 32,0	proteína; proteína
1541,56; 76,8	proteína; amido	1711,0; 32,0	ácidos gordos; proteína
1002,1; 79,9	amido; amido C4	<b>PC2 (-)</b>	
1002,1; 65,7	amido; amido C do anel	3333,1; 31,7	O-H; lípido alifático
1002,1; 32,7	amido; proteína ou lípido alifático	2924,7; 32,0	C-H; proteína ou lípido alifático
		1107,6; 32,0	amido; proteína ou lípido alifático

De entre as interações referidas anteriormente, os pares  $1653\text{ cm}^{-1}$  vs.  $75,3\text{ ppm}$ ;  $1653\text{ cm}^{-1}$  vs.  $64,3\text{ ppm}$ ;  $1542\text{ cm}^{-1}$  vs.  $76,8\text{ ppm}$  e  $1002\text{ cm}^{-1}$  vs.  $32,7\text{ ppm}$  foram considerados os mais relevantes. Os primeiros três correlacionam o amido com as proteínas e o último correlaciona o amido com proteína ou lípido alifático. Estas correlações poderão indicar que o cozimento induz alterações estruturais entre amido e proteína.

## 4.4 Conclusões

Os espectros de FT-IR das amostras de sorgo e de milho, cruas e cozidas, mostraram que, para além de alterações a nível das proteínas e do amido, o cozimento promoveu, ainda, alterações a nível da fracção lipídica.

Estas variações são sentidas de forma distinta nas diversas variedades de farinha estudada, as variedades K LW e KAT 369 parecem ser as mais afectadas. Nestas variedades, o sinal característico da presença de triglicéridos quase desaparece com o cozimento.

As suspeitas da alteração da fracção lipídica da farinha com o cozimento foram confirmadas através do estudo de RMN SPE  $^{13}\text{C}$ . Enquanto que no milho os lípidos mantêm a sua mobilidade, no sorgo o cozimento induz redução da mobilidade lipídica.

A análise em componente principais, aplicada aos sinais obtidos através de ambas técnicas espectroscópicas (FT-IR e RMN), mostrou, consistentemente, que o milho tem comportamento distinto do sorgo, principalmente no que diz respeito às amostras cozidas. A análise em componente principais aplicada a espectros de SPE  $^{13}\text{C}$  confirmou que as maiores diferenças entre amostras de sorgo e milho está correlacionada com os lípidos móveis.

A aplicação de OPA aos sinais espectroscópicos veio reforçar estas diferenças e indicar possíveis correlações que podem ser traduzidas na existência de interacções proteína-amido e proteína-lípido.

Morrison (1978) mostrou ser possível a formação de complexos de inclusão, entre lípidos e amido, aquando da gelatinização deste.

Interacções entre proteína e lípidos foram já referidas por Abd El-Motaal (1998) para produtos à base de soja, foi sugerido que estas interacções seriam responsáveis por redução dos valores de digestibilidade proteica (Taha e Mohamed, 2004).

O papel dos lípidos no cozimento da farinha é uma nova contribuição para a explicação da diminuição dos valores da digestibilidade proteica com o cozimento, no entanto a sua contribuição ainda não está completamente estabelecida. A formação das referidas interacções pode proteger a proteína do ataque enzimático resultando uma redução dos valores da digestibilidade.

## 4.5 Bibliografia

- Abd El-Motaal; E. A., Helmy; H. E., Taha; F. S.; Sohoeb, Z. E. e (1998) Effect of dry and moist heating on the formation of lipid-protein complex in soy bean products. Proceedings of the 47th oil seed conference, New Orleans, Louisiana, March 8-10.
- Axtel J.D.; Kirleis, A. W.; Hassen, M.M.; Mason, N.C.; Mertz,E.T. e Munch, L. (1981) Digestibility of sorghum proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 78, 1333-1335.
- Bandekar, J. (1992) Amide mode and protein conformation *Bioch. and Bioph. Acta* **1120**: 123-143.
- Barros A. (1999) Contribution à la sélection et la comparaison de variables caractéristiques. *Tese Doutorado*, Institut Nationale Recherche Agronomique: Paris, France.
- Bueno, W.A. (1989) Manual de espectroscopia vibracional, McGraw-Hill, 210-259.
- Duodu,K.G.; Tang, H.; Grant, A.; Wellner, N.; Belton, P.S. e Taylor, J.R.N. (2001) FTIR and solid state <sup>13</sup>C NMR spectroscopy of proteins of wet cooked and popped sorghum and maize, *J. Cereal Sci.*, **33**, 261-269.
- Gil, A.M.; Alberti, E.; Tatham, A.S.; Belton, P.S.; Humpfer, E. e Spraul (1997) Magic angle spinning NMR study of the hydration of the wheat seed storage protein omega-gliadins. *Mag. Res. Chem.* **35**: 101-111.
- Jolliffe, I.T. (1986) Principal component analysis, Springer-Verlag, New York.
- McGrath, R.M.; Kaluzo, W.Z.; Daiber, K.H.; William, B. e Glaine, C.W. (1982) Polyphenols of sorghum grain, their changes during malting and their inhibitory nature, *J. Agric. Food Chem.* **30**: 450-456.
- Morrison, W.R. (1978) Cereal lipids in *Advances in Cereal Science and technology* (Y. Pmeraz Ed.) Americam Chemistry Society, St. Paul, MN, 221-348.
- Nunes, A.; Taylor, J. e Delgadillo, I. (1997) Study by FTIR of Temperature on Sorghum Starch in *Spectroscopy of Biological Molecules: Modern Trends* (P. Carramona, R. Navarro and Hernanz, Eds.) Kluwer Academic Publishers, 286-287.

Paulis, J.W. e Wall, J.S. (1979) Distribution and electrophoretic properties of alcohol-soluble proteins in normal and high-lysine sorghums, *Cereal Chem.*, 56(1), 20-23.

Rutledge, D.N.; Barros, A.S. e Giangiacomo, R. (2001) Interpreting near infrared spectra of solutions by outer product analysis with time domain NMR *in* Advances in Magnetic Resonance in Food Science, Royal Society of Chemistry (Eds. P. Belton, I. Delgadillo, A.M. Gil, G.A. Webb ) pp. 179-192.

Taha, F. S. e Mohamed, S. S. (2004) Effect of different denaturing methods on lipid protein complex formation. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* 37, 99-104.

# Análise de géis de SDS-PAGE

## 5.1 Introdução

A electroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE) é uma técnica poderosíssima no que diz respeito à caracterização de amostras de proteínas, uma vez que nos permite simultaneamente uma análise qualitativa e quantitativa das amostras.

Uma vez que a aplicação de técnicas electroforéticas é uma constante no decorrer deste trabalho e, conseqüentemente, a interpretação de electroforegramas é de extrema importância, tornou-se imperativo desenvolver um método eficaz de análise de imagem que pudesse ser aplicado com sucesso à análise de géis de SDS-PAGE.

Nas electroforeses as amostras são separadas de acordo com o seu tamanho, carga eléctrica ou outras propriedades físicas. As proteínas são forçadas, sob acção de um campo eléctrico, a passar através da malha do gel. Os electroforegramas obtidos são analisados de forma a determinar o peso molecular de cada proteína, por comparação com proteínas de peso molecular conhecido, e é ainda possível determinar a quantidade de proteína presente em cada banda electroforética.

No que diz respeito à análise qualitativa esta é possível uma vez que a mobilidade (valores de  $R_f$ ) de cada um dos componentes proteicos da amostra no gel está relacionada com o seu peso molecular. Cada um dos electroforegramas é calibrado pela aplicação, num dos poços do gel, de um conjunto de proteínas de peso molecular conhecido. Caso a concentração de acrilamida do gel seja uniforme, a escala de pesos moleculares é função exponencial da mobilidade proteica.

Por sua vez, a análise quantitativa é possível porque a concentração de cada um dos componentes proteicos está relacionada com a percentagem de

corante que cada uma das bandas electroforéticas retêm; conhecendo a densidade de cor de cada uma das bandas electroforéticas pode extrapolar-se a quantidade de proteína nela presente. Este tipo de análise é bastante difícil de efectuar e normalmente requer a utilização de programas informáticos, comercializados por diversas companhias, que são bastante dispendiosos.

Têm vindo a ser desenvolvidos diversos estudos para analisar electroforegramas. Alguns trabalhos aplicam algoritmos, que funcionam como filtros interactivos e que tentam resolver determinados problemas relacionados com a detecção e correcção da forma dos trilhos electroforéticos (Machado *et al.* 1997). Tem vindo a ser desenvolvido muito trabalho com objectivo principal da realização de análises quantitativas e qualitativas precisas, particularmente quando o gel não é perfeito, como ocorre no caso de sobreposição de bandas electroforéticas. Bajla *et al.* (2001) aplicaram tratamentos de imagens 2 D a imagens 1 D, em vez da típica aplicação de deconvolução Gaussiana 1 D. Este método foi adaptado de forma a permitir uma detecção mais vasta das bandas electroforéticas

Muita da análise quantitativa efectuada até à data recorreu a metodologias de ajustamento de curvas, acopladas a regressão linear de mínimos quadrados para deconvolução de bandas sobrepostas (Shadle *et al.* 1997).

Como se pode verificar, os estudos desenvolvidos tentam solucionar problemas das imagens dos géis. Estes problemas são bastante comuns e passam por distorção geométrica do gel, deformação horizontal dos trilhos electroforéticos e ainda distribuição de brilho não homogénea.

O trabalho aqui apresentado utiliza um digitalizador convencional para obtenção da imagem digital dos electroforegramas e as imagens são submetidas a uma tratamento utilizando um algoritmo adaptado (Barros *et al.* 1999) de forma à obtenção do perfil electroforético de cada um dos trilhos electroforéticos do gel.

Este tipo de tratamento, para além de ser bastante simples e barato, garante ainda a resolução de alguns dos problemas mencionados anteriormente, possibilitando a obtenção de perfis electroforéticos de grande qualidade. A melhoria da qualidade destes perfis, ou seja a melhoria na



resolução dos picos correspondentes às bandas electroforéticas, originou melhores resultados quer qualitativos quer quantitativos.

Numa primeira parte, proceder-se-á à visualização do que o tratamento matemático faz aos perfis electroforéticos de forma a que se perceba a sua importância na determinação dos  $R_f$  das bandas electroforéticas. Numa segunda fase, aplicar-se-á o tratamento electroforético à análise quantitativa dos electroforegramas. Para tal desenvolveu-se uma calibração de proteína em géis de SDS-PAGE.

## 5.2 Metodologia

- 1º Obtenção dos electroforegramas.
- 2º Digitalização das imagens.
- 3º Aplicação do filtro para tratamento das imagens.
- 4º Obtenção do perfil electroforético.
- 5º Análise qualitativa (determinação  $R_f$ ) ou quantitativa (cálculo áreas).

### 5.2.1 SDS-PAGE

Para a análise electroforética da proteína (SDS-PAGE) foi utilizado o equipamento Mini-Protean II (Bio-Rad).

A amostra de proteína foi dissolvida em, 0,0625 M Tris com 2% (w/v) SDS, 10% (v/v) glicerol e 0,01% (w/v) azul de bromofenol a pH 6,8 (tampão amostra), em seguida a amostra foi fervida durante 5 minutos. A electroforese foi realizada em géis de 12,5% (w/v) de acrilamida de acordo com o método de Leammli.

Os géis foram revelados com Coomassie Blue R (Pharmacia) e descorados com 40% (v/v) metanol e 10% (v/v) ácido acético até o fundo apresentar a coloração desejada (Shewry *et al.* 1995).

## 5.2.2 Preparação das amostras

### 5.2.2.1 Análise qualitativa

Como primeiro exemplo foram aplicados no gel de electroforese 7  $\mu\text{L}$  de marcador molecular comercial (BioRad). O trilha electroforético apresentado foi escolhido por não apresentar defeitos.

O segundo exemplo apresentado resultou da mistura de dois tipos de marcadores moleculares comerciais (BioRad) e foi escolhido por apresentar defeitos visíveis: bandas electroforéticas demasiado juntas e de diferente dimensões. Um perfil electroforético determinado directamente a partir deste trilha e sem tratamento prévio conduziria a resultados erróneos.

Para determinar o peso molecular exacto de uma proteína utilizou-se um trilha electriforético com marcadores de peso molecular conhecido e um trilha com uma proteína de peso molecular conhecido e referenciada inúmeras vezes nas literatura – kafirina  $\gamma$  de 28 kDa.

### 5.2.1.2 Análise quantitativa

0,4 mg de albumina de ovo de 45 kDa (proteína purificada - Sigma) dissolveu-se em 1 mL de tampão de amostra.

De modo a obter diferentes concentrações de amostra, foi aplicado em cada poço diferente volume de solução de proteína. Para calibração foi utilizado um conjunto de 20 volumes de amostra: 0,5; 0,75; 1,0; 1,25; 1,5; 1,75; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0; 10,0; 11,0; 12,0; 13,0; 14,0; 15,0  $\mu\text{L}$  da solução de 0,4 mg/mL de proteína que correspondem a 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 1,2; 1,6; 2,0; 2,4; 2,8; 3,2; 3,6; 4,0; 4,4; 4,8; 5,2; 5,6 e 6,0  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , respectivamente. As amostras foram distribuídas em dois géis distintos como mostra a Tabela 5.1.

**Tabela 5.1:** Caracterização das amostras usadas para electroforese – correspondência entre o volume de amostra aplicado em cada poço electroforético e a concentração de proteína.

Gel 1	Volume ( $\mu\text{L}$ ) da solução de 0,4 mg/mL	0,5	0,75	1,0	1,25	1,5	1,75	2,0	3,0	4,0	5,0
	Concentração de proteína ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	1,2	1,6	2,0
Gel 2	Volume ( $\mu\text{L}$ ) da solução de 0,4 mg/mL	6,0	7,0	8,0	9,0	10,0	11,0	12,0	13,0	14,0	15,0
	Concentração de proteína ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )	2,4	2,8	3,2	3,6	4,0	4,4	4,8	5,2	5,6	6,0

Para validação do modelo de calibração, foi empregue um conjunto de 6 amostras (6,0; 8,0; 10,0; 12,0; 14,0; 15,0  $\mu\text{L}$  da solução de 0,4 mg/mL de proteína correspondentes a 2,4; 3,2; 4,0; 4,8; 5,6 e 6,0  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) (Tabela 5.2).

**Tabela 5.2:** Caracterização das amostras usadas na validação - correspondência entre o volume de amostra aplicado em cada poço electroforético e a concentração de proteína.

Gel 3	Volume ( $\mu\text{L}$ ) da solução de 0,4mg/mL	6,0	8,0	10,0	12,0	14,0	15,0
	Concentração de proteína ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )	2,4	3,2	4,0	4,8	5,6	6,0

### 5.2.3 Tratamento aplicado aos géis

Os géis de SDS-PAGE foram digitalizados directamente, sem secagem prévia, num Hewlett Packard ScanJet 3600C. As imagens obtidas foram convertidas numa matriz representativa dos diferentes níveis de cor (pseudo-imagem).

Cada um dos trilhos correspondentes a cada amostra foram separados dos restantes e submetidos a um tratamento matemático baseado na teoria de probabilidades condicionais (Barros *et al.* 1997). Como resultado, são

obtidas uma matriz independência e uma matriz diferença. A matriz independência corresponde a uma imagem com ruído reduzido e é calculada a partir do produto das margens inferior e direita da matriz original. A margem inferior é proporcional à média de cada coluna, enquanto que a margem direita é proporcional à média de cada linha. Esta matriz, produto de dois conjuntos de médias, contém menos ruído que a matriz original. Supondo que a matriz original é  $\mathbf{X}_{(n, m)}$ , onde  $n$  é o número de linhas e  $m$  o número de colunas, as margens inferiores e direita ( $\mathbf{r}$ ,  $\mathbf{b}$ ) são definidas respectivamente por:

$$r_i = \sum_{j=1}^m x_{ij} \text{ e } b_j = \sum_{i=1}^n x_{ij}$$

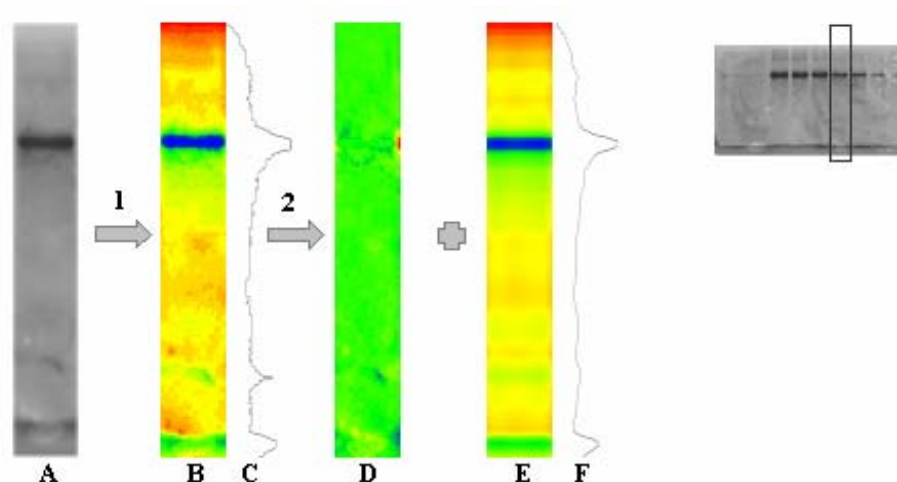
onde  $i$  é o índice das linhas e  $j$  é o índice das colunas.

A matriz independência  $\mathbf{Q}_{(n,m)}$  é, então, definida pelo produto dos vectores margem  $\mathbf{r}_{(n,1)}$  e  $\mathbf{b}_{(1,m)}$ :

$$\mathbf{Q}_{(n, m)} = \mathbf{r}_{(n,1)} \mathbf{b}_{(1,m)}^T.$$

O conceito subsequente à matriz independência é simples: as linhas (onde estão localizadas as amostras) e as colunas (relacionadas com a migração das moléculas) da matriz original são independentes, o que significa que a referida matriz é igual à matriz original. No entanto as condições experimentais são sujeitas a fenómenos físico-químicos que induzem alterações no formato das bandas electroforéticas, consequentemente ao calcular a matriz independente esses efeitos são parcialmente eliminados. Por outro lado, a matriz diferença mede a variabilidade não modelada pela matriz independência. Cada banda da matriz independência representa um perfil com menos ruído do que a banda original e, de onde o máximo é recuperado por análise quantitativa.

Desta forma, a partir da matriz independência calcula-se a distribuição (normal) mais provável para a informação contida na imagem do gel, obtendo-se, assim o respectivo perfil electroforético tendo em conta o máximo dessa distribuição. Uma vez que o ruído é reduzido, o perfil electroforético obtido é, também ele, menos ruidoso (Figura 5.1).



**Figura 5.1:** Resumo do tratamento a que cada uma dos trilhos é submetido. **A** – electroforegrama, **B** – imagem de código colorido, **C** – perfil electroforético obtido a partir da imagem código, **D** – matriz diferença, **E** – matriz independência, **F** – perfil electroforético obtido a partir da matriz independência, **1** – conversão de cores, **2** – tratamento matemático baseado teoria de probabilidades condicionais.

Todas as regiões correspondentes às bandas electroforéticas de todos os perfis electroforéticos foram submetidas a uma determinação de área com o auxílio do programa Origin<sup>®</sup>, Microcal software Inc., USA.

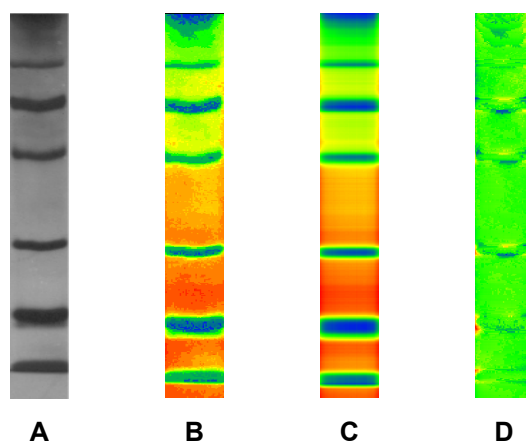
## 5.3 Resultados e discussão

### 5.3.1 Análise qualitativa

Como foi referido anteriormente, a maioria dos géis apresenta defeitos de diversas origens. Se os perfis electroforéticos forem obtidos directamente a partir da imagem do gel sem tratamento, os resultados das determinações dos valores de  $R_f$ , e consequentemente dos pesos moleculares das proteínas serão erróneos.

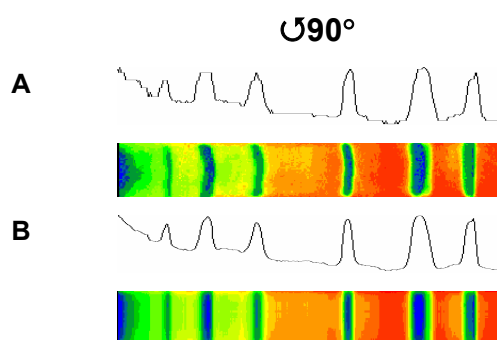
Na Figura 5.2 é apresentado um trilho electroforético onde correu uma alíquota de um marcador molecular Broad Range (BioRad) (**A**). São também

apresentadas na figura as etapas do tratamento electroforético (**B** e **D**) assim como a imagem tratada, após a aplicação do filtro (**C**).



**Figura 5.2:** Análise correspondente ao electroforegrama que apresenta bandas bem definidas. **A** – electroforegrama; **B** – imagem de código colorido; **C** – matriz independência e **D** - matriz diferença.

Como se pode verificar, a aplicação do filtro a electroforegramas que apresentem bandas electroforéticas bem definidas serve apenas para corrigir a forma dessas bandas. No entanto, o perfil electroforético melhora significativamente (Figura 5.2).

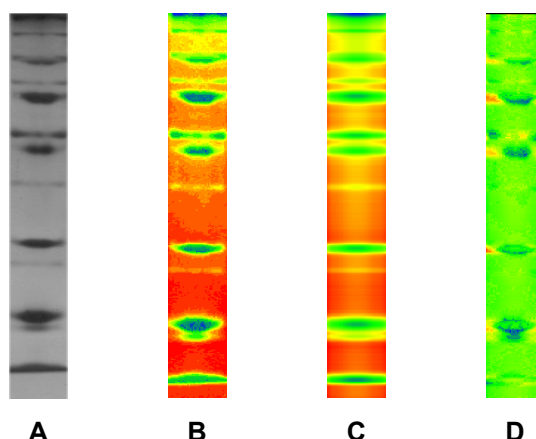


**Figura 5.3:** Comparação entre o perfil electroforético obtido a partir de imagem colorida (**B**) e o perfil electroforético obtido a partir da matriz independência (**D**).

Esta correcção serve para a optimização do perfil electroforético, como se pode verificar pela comparação entre os dois perfis apresentados na Figura 5.3. Pode verificar-se um incremento da relação sinal ruído quando se

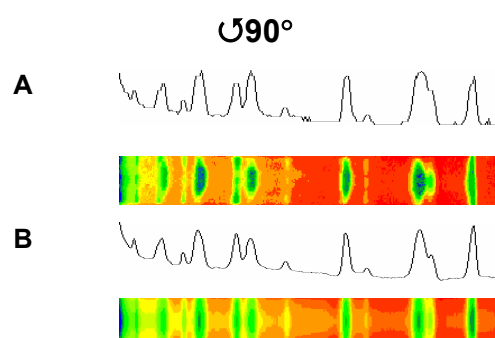
passa de um perfil obtido directamente a partir da imagem colorida para um obtido a partir da matriz independência.

Uma grande parte dos géis de SDS-PAGE não apresenta, como no exemplo apresentado anteriormente, bandas electroforéticas perfeitas. Nesses casos, a sua interpretação é dificultada e a necessidade de um tratamento da imagem torna-se de mais evidente.



**Figura 5.4:** Análise correspondente ao electroforegrama que apresenta bandas irregulares. **A** – imagem sem tratamento; **B** – imagem colorida; **C** – matriz independência e **D** - matriz diferença.

Neste caso, a aplicação do filtro em géis que apresentam bandas electroforéticas irregulares possibilita um aperfeiçoamento da forma, dimensões e resolução das bandas electroforéticas. Consequentemente, o perfil electroforético obtido conferirá informação mais fidedigna.

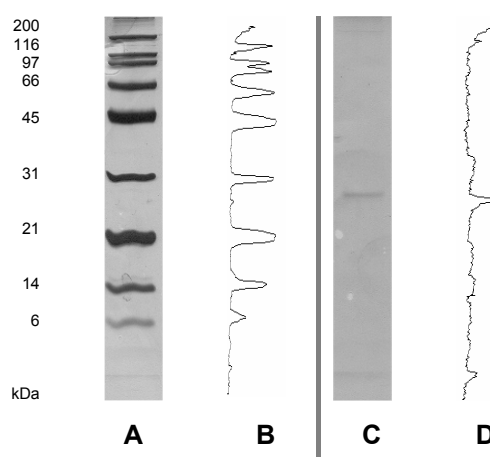


**Figura 5.5:** Comparação entre o perfil electroforético obtido a partir de imagem colorida (**A**) e o perfil electroforético obtido a partir da matriz independência (**B**).

A Figura 5.5 atesta a notável melhoria do perfil electroforético quando este é obtido a partir da imagem correspondente à matriz independente.

### 5.3.1.1 Caso prático

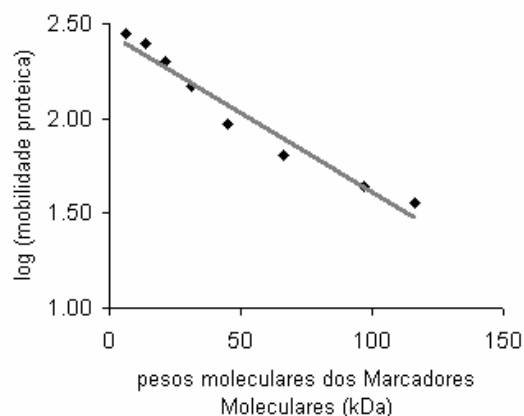
Partindo-se de um gel correspondente a uma amostra real pretendeu efectuar-se uma análise qualitativa - determinação do peso molecular da proteína. Para tal foi necessário calibrar o gel com padrões moleculares de massa molecular conhecida (Figura 5.6 A).



**Figura 5.6:** Trilho electroforético correspondente a marcadores moleculares (A) e a uma amostra real (C) e os perfis electroforéticos correspondentes (B e D).

Após determinação da mobilidade de cada uma das proteínas da mistura, a partir do perfil electroforético (B) pode correlacionar-se os pesos moleculares dos padrões com o logaritmo da distância percorrida no gel (Figura 5.7). Depois de se obter o perfil electroforético da amostra (Figura 5.6 D) e de se determinar a distância percorrida pela proteína no gel, pode extrapolar-se o peso molecular da amostra.





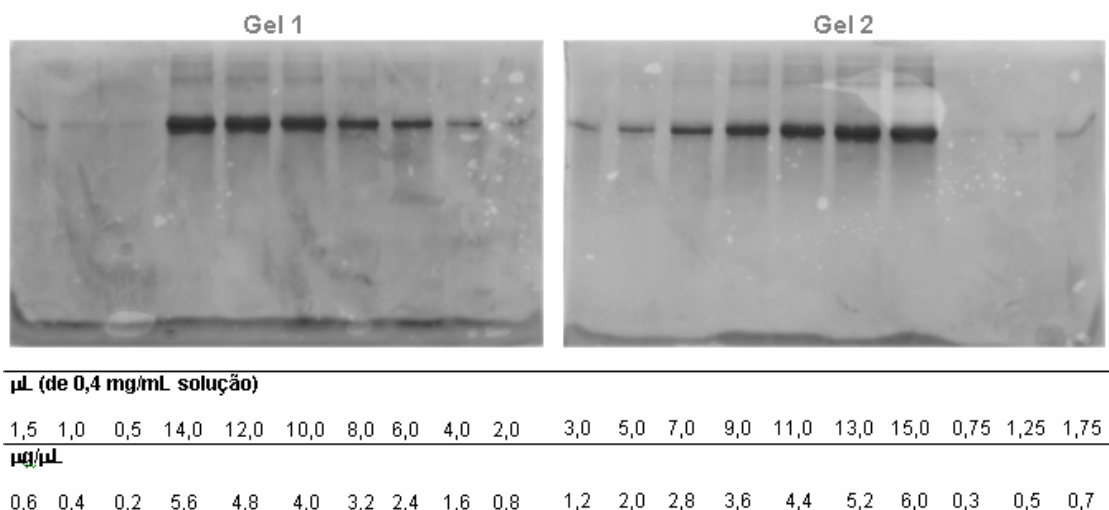
**Figura 5.7:** Correlação entre pesos moleculares dos Marcadores Moleculares e logaritmo da mobilidade proteica ( $y = -0,0084 \cdot x + 2,45$  e  $R^2 0,96$ ).

Utilizando a correlação obtida (Figura 5.7) determinou-se o peso molecular exacto da proteína em questão: 29 kDa.

Como se pode verificar pelos exemplos apresentados, o filtro melhora os perfis electroforéticos uma vez que os picos correspondentes às bandas electroforéticas ficam melhor resolvidos e os máximos mais definidos. Melhora-se, então, a determinação da mobilidade proteica e, consequentemente, há uma melhoria da análise qualitativa.

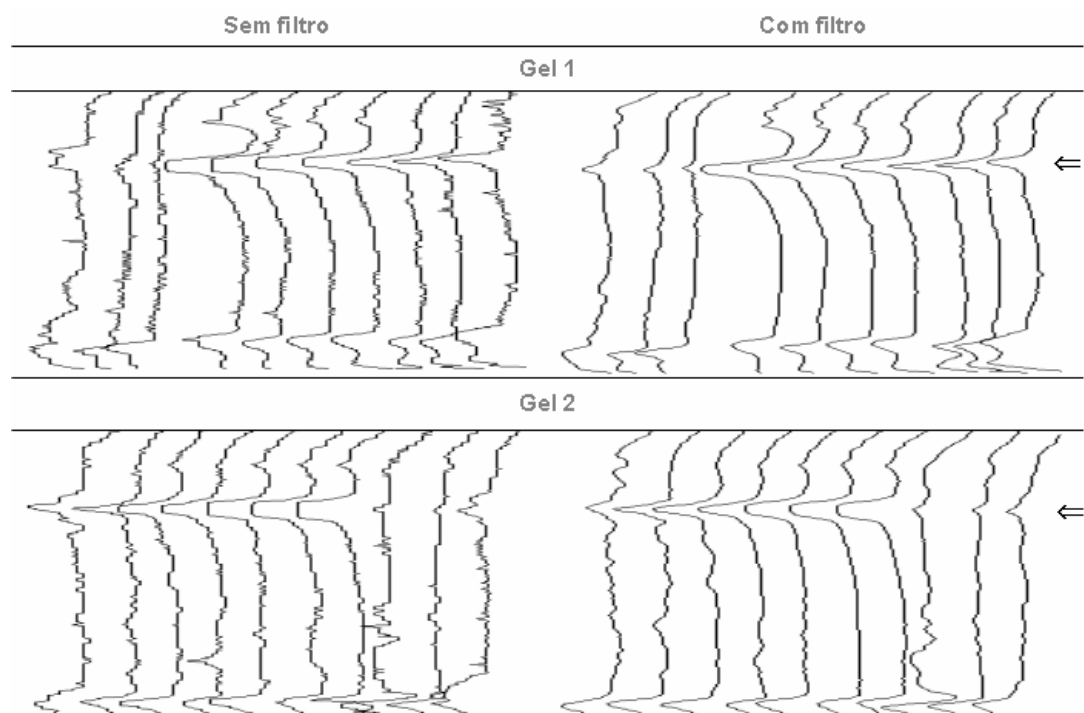
### 5.3.2 Análise quantitativa

Apresentam-se dois géis de electroforese, cada qual com 10 amostras de concentração diferente (Figura 5.6).



**Figura 5.8:** Electroforegramas utilizados para calibração - total de 20 diferentes concentrações da mesma amostra (Gel 1 e Gel 2).

Pela observação de ambos os géis pode ser verificado que dependendo da concentração de cada uma das amostras a intensidade da banda electroforética varia (Figura 3.8).

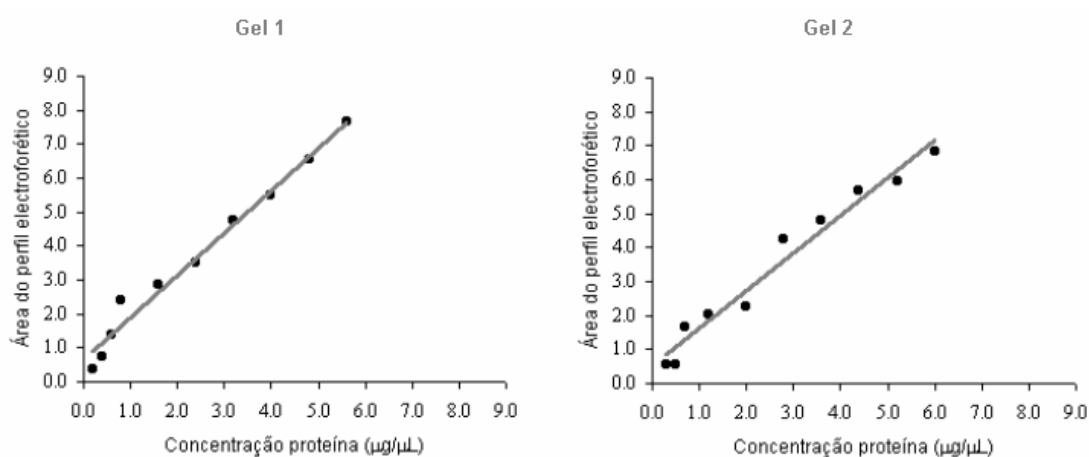


**Figura 5.9:** Comparação entre os perfis electroforéticos antes e após aplicação do tratamento matemático ( $\Leftarrow$  região correspondente à banda electroforética).

Como foi referido anteriormente, o tratamento matemático aplicado funciona como um filtro que permite melhorar a determinação da concentração de proteína presente na banda electroforética. A Figura 5.9 mostra a redução do ruído nos perfis electroforéticos como consequência do incremento da resolução após aplicação da teoria de probabilidades condicionais.

Todas as regiões correspondentes às bandas electroforéticas de todos os perfis electroforéticos foram submetidas a uma determinação de área com o auxílio do programa Origin®, Microcal software Inc., USA.

A partir deste ponto, após determinação das áreas, é possível estabelecer uma correlação entre a dimensão do perfil electroforético (área) e a concentração de proteína nela presente. Então, pode traçar-se um gráfico da concentração de proteína vs. a área da banda electroforética.

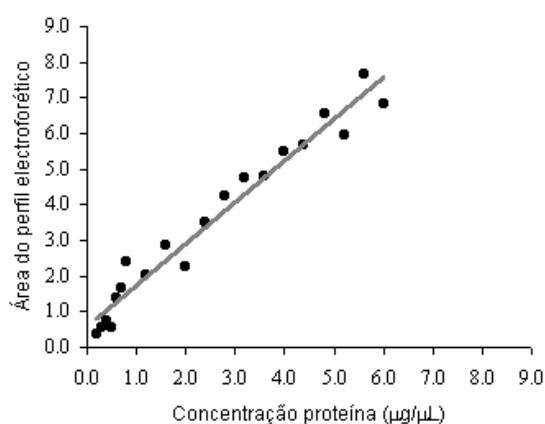


**Figura 5.10:** Correlação entre a concentração de proteína (µg/µL) e área das bandas electroforéticas. Estas correlações resultam separadamente do Gel 1 e Gel 2.

Tendo em conta o erro envolvido durante toda a análise electroforética, os coeficientes de correlação são bastante aceitáveis: 0,98 ( $R^2$ ) para o Gel 1 e 0,97 ( $R^2$ ) para o Gel 2 (Figura. 5.10).

Se a determinação da área electroforética fosse efectuada sem o tratamento matemático a linearidade seria inferior. O coeficiente de correlação seria de 0,86 ( $R^2$ ) para o Gel 1 e de 0,87 ( $R^2$ ) para o Gel 2.

De modo a incrementar o número de pontos do modelo de calibração, os valores correspondentes ao Gel 1 foram combinados com os valores do Gel 2. Da combinação dos valores de ambos os géis obteve-se um modelo de calibração com coeficiente de correlação de 0,96 ( $R^2$ ) (Figura. 5.11).



**Figura 5.11:** Correlação entre a concentração de proteína ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) e as áreas dos perfis electroforéticos. Esta correlação resulta da combinação dos valores do Gel 1 e do Gel 2.

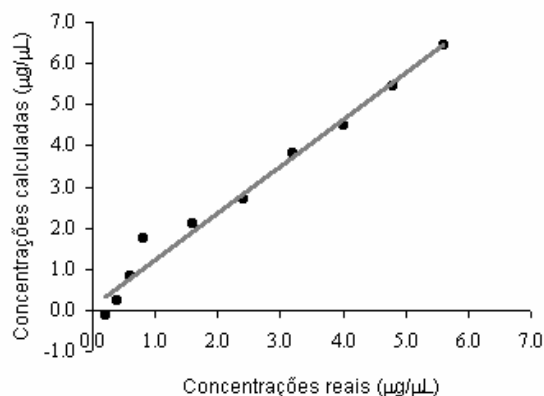
Caso não se tivesse aplicado o referido tratamento matemático o coeficiente de correlação seria de 0,77 ( $R^2$ )

Foi, então, estabelecido um modelo de calibração com 20 pontos para a determinação da concentração da proteína da albumina do ovo com 45 kDa directamente a partir de géis de SDS-PAGE.

#### 5.3.2.1 Validação interna

Para validação do modelo de calibração do Gel 2 (apresentado na Figura 5.6) utilizaram-se as áreas das bandas electroforéticas correspondentes ao Gel 1.

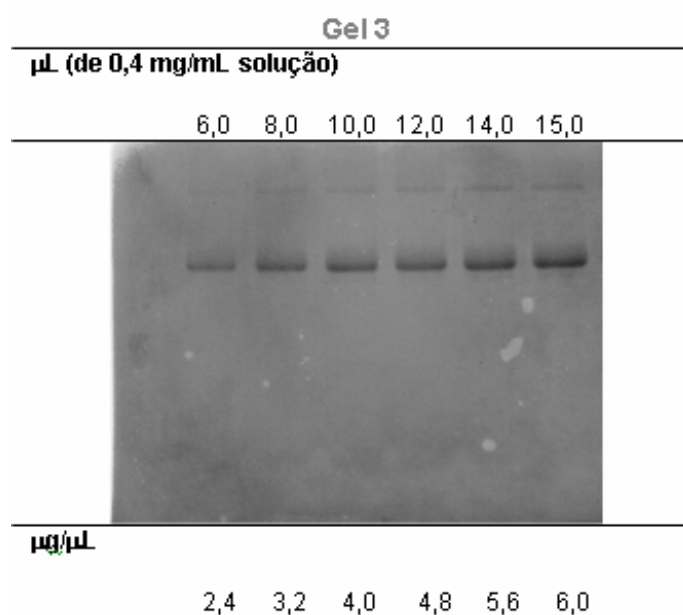
As concentrações calculadas foram correlacionadas com as concentrações reais obtendo-se um coeficiente de correlação de 0,98 (Figura 5.12).



**Figura 5.12:** Concentrações reais vs. concentrações previstas, referentes às amostras do Gel 1; foi utilizada a correlação estabelecida para o Gel 2 ( $y = 1,1107 \cdot x + 0,4924$ ).

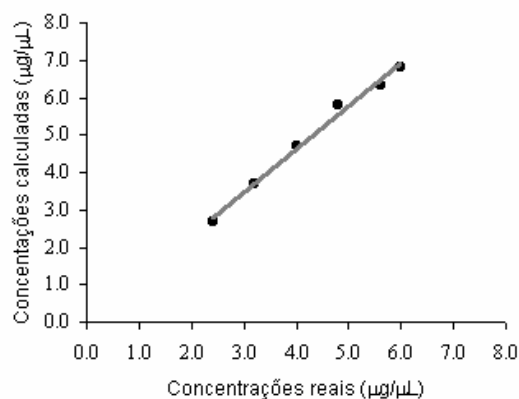
### 5.3.2.2 Validação externa

O modelo de calibração com 20 pontos foi aplicado a um novo conjunto de amostras de proteínas de um gel de 12,5% (w/v) acrilamida – Gel 3 (Figura 5.13). O limite de concentração destas amostras é compatível com o intervalo de concentração das amostras usadas no modelo de calibração. Foi aplicado o mesmo tratamento a este novo conjunto de amostras.



**Figura 5.13:** Electroforegrama usado para a validação externa (Gel 3), com as concentrações reais e as concentrações previstas.

Foi possível prever a concentração de proteína das bandas electroforéticas. Para 2,4; 3,2; 4,0; 4,8; 5,6; 6,0 e 2,0  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  o modelo previu 2,7; 3,7; 4,7; 5,8; 6,3; 6,8; e 1,7  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , respectivamente.



**Figura 5.14:** Concentrações reais vs. concentrações previstas das amostras do Gel 3; foi utilizada nos cálculos a correlação estabelecida para Gel 1 + Gel 2 ( $y = 1.1692 * x + 0.5714$ ).

Quando as concentrações reais foram comparadas com as concentrações previstas foi obtida um coeficiente de correlação de 0.99 ( $R^2$ ) (Figura 5.14).

## 5.4 Conclusões

O método aplicado no tratamento de electroforegramas permite uma melhoria significativas dos perfis electroforéticos.

A melhoria dos perfis electroforéticos, para além de uma determinação mais precisa da mobilidade electroforética permite ainda uma determinação quantitativa da proteína presente em cada uma das bandas electroforéticas.

Com a aplicação do filtro baseado na matriz independência foi estabelecido um modelo com 20 pontos, para a calibração da concentração de albumina de ovo (45 kDa).

Foi possível aplicar o modelo de calibração para um novo conjunto de amostras prevendo a sua concentração. Quando as concentrações reais

foram comparadas com as concentrações previstas foi obtida um coeficiente de correlação de 0,99 ( $R^2$ ).

Este tratamento foi aplicado a electroforegramas de amostras reais, permitindo uma análise qualitativa mais exacta e uma análise quantitativa precisa, acrescentou, portanto, uma mais valia significativa ao trabalho aqui apresentado.

## 5.5 Bibliografia

Bajla, I.; Hollander, I. e Burg, K. (2001) Improvement of the electrophoretic gel image analysis, *Measurement Sci. Review* 1 (1), 5-10.

Barros A. (1999) Contribution à la sélection et la comparaison de variables caractéristiques. *Tese Doutorado*, Institut Nationale Recherche Agronomique: Paris, France.

Barros, A.S.; Safar, M.; Devaux, M.F.; Robert; Bertrand, D. e Rutledge, D.N. (1997) Relations between Mid Infrared and Near Infrared Spectra Detected by Analysis of Variance of an Intervariable Data Matrix. *App. Spectroscopy* 51, 1384-1393.

Machado, A.M.C.; Campos, M.F.M.; Siqueira, A.M. e Carvalho, O.S.F. (1997) An interactive algorithm for segmenting lanes in gel electrophoresis images, XI SIBGRAPI, Brazil, IEEE Press.

Shadle, S.E.; Allen, D.F.; Guo, H.; Pogozelski, W. K.; Bashkin, J. S. e Tullius, T.D. (1997) Quantitative analysis of electrophoresis data: novel curve fitting methodology and its application to the determination of protein-DNA binding constant, *Nucleic Acids Res.* 25 (4), 850-860.

Shewry, P.R.; Tathan, A.S. e Fido, R.J. (1995) Separation of plant Proteins by Electrophoresis *in* Plant Gene Transfer and Expression Protocols (H. Jones Ed.) Humana Press: Totowa, New Jersey.





# Caracterização de zeínas e kafirinas

## 6.1 Introdução

Em 1914 Osborne e Mendel desenvolveram um procedimento para a extracção sequencial de proteínas de cereais, que deu origem à sua classificação de acordo com a solubilidade. Segundo esta classificação, as proteínas eram agrupadas em albuminas (solúveis em água), globulinas (solúveis em soluções salinas), prolaminas (solúveis em soluções alcoólicas) e glutelinas (solúveis em soluções alcalinas).

Ainda hoje o fraccionamento das proteínas dos cereais recorrendo a diferentes solventes continua a ser baseado no método de Osborne e Mendel. No entanto, de modo a aumentar a eficiência da extracção têm vindo a ser introduzidas alterações.

Em 1970, Landry e Moureaux introduziram duas importantes alterações ao procedimento de extracção: o uso de solução alcoólica com agente redutor após a extracção com solução alcoólica e uma extracção final com tampão básico contendo dodecil-sulfato de sódio (SDS) e agente redutor. Estas alterações resultaram no incremento da extracção das proteínas, passando-se a extrair de 89% das proteínas do grão de milho (Jambunathan e Mertz 1973) em vez de 31% (Skotch *et al.* 1970).

Durante muitos anos os procedimentos utilizados para extracção das proteínas do sorgo, consistiam em adaptações dos procedimentos usados para os restantes cereais. No entanto, sabe-se que devido à sua natureza hidrofóbica as prolaminas do sorgo são menos solúveis que as do milho (Wall e Paulis, 1978).

Posteriormente, Taylor *et al.* (1984 a) desenvolveram estudos no sentido de obter um procedimento de extracção adaptado às prolaminas do sorgo. Neste procedimento o álcool utilizado passou a ser t-butanol a 60% em vez de isopropanol a 70% (Jambunathan e Mertz 1973 e Guiragossian 1978) sendo o t-butanol também usado na extracção com agente redutor (Paulis e Wall 1979). Desta forma foi estabelecido um procedimento para extracção sequencial das proteínas de sorgo: albuminas e globulinas são extraídas com solução de NaCl 1,25 M seguindo-se uma extracção com água e diálise. As prolaminas são extraídas com t-butanol a 60% com 0,05% de ditioneína (DTT – agente redutor), todas estas extracções são desenvolvidas à temperatura ambiente.

Outro método para solubilizar as proteínas de sorgo foi desenvolvido por Flidell e Koberhel (1985). Estes autores mostraram que mais de 95% das proteínas da farinha do grão de sorgo são solubilizadas em soluções de sais de ácidos gordos. Demonstraram ainda que sabões com cadeias hidrocarbonadas curtas (C10, C12 e C14) são mais eficientes do que sabões com cadeias longas e que a temperatura favorece a extracção. Os resultados destes estudos sugerem que as proteínas estão fortemente agregadas, maioritariamente por ligações hidrofóbicas, e que as pontes dissulfeto exercem menor influência na solubilidade.

Em 1990, Wallace *et al.* desenvolveram um novo método para a extracção das proteínas do milho. Este método baseia-se na extracção total das proteínas do grão, usando tampão borato a pH 10 com SDS a 1% e 2-mercaptoetanol a 2%. O extracto total é submetido a uma extracção selectiva, as prolaminas são extraídas por adição de álcool até 70% do volume total. Desta forma consegue separar-se as prolaminas das albuminas, globulinas e glutelinas, que não sendo solúveis em álcool, precipitam.

Posteriormente, Hamaker *et al.* (1995) utilizaram o procedimento desenvolvido por Wallace *et al.* (1990) para quantificar as proteínas de sorgo e comparar com o método desenvolvido por Landry e Moureaux. Concluíram que, utilizando este novo método, a quantidade de prolaminas extraída era consideravelmente superior (Taylor *et al.* 1984 a; Hamaker *et al.* 1986).

No que diz respeito à localização das diversas fracções proteicas no grão de sorgo, as albuminas e as globulinas estão localizadas nas partes mais

externas, as glutelinas estão uniformemente distribuídas por todo o grão e as kafirinas encontram-se no seu interior (Chibber *et al.* 1978).

As prolaminas e as glutelinas são as principais proteínas de reserva. As prolaminas representam aproximadamente 70% das proteínas totais e 80% das proteínas do endosperma (Hamaker *et al.* 1995).

As proteínas de reserva de todas os cereais estão localizadas em corpos proteicos (Ashton, 1976). A composição destes organelos foi investigada recorrendo a métodos de extracção selectivos, estes estudos revelaram que eram constituídos por prolaminas (Sekinger e Wolf, 1973; Taylor *et al.* 1984 b). Estudos de microscopia de transmissão electrónica (TEM) revelaram haver relações entre o retículo endoplasmático rugoso e os corpos proteicos; no caso concreto do sorgo verificou-se que as kafirinas são sintetizadas em ribossomas e depois transportadas, na forma de polipéptidos, através do retículo endoplasmático rugoso durante o desenvolvimento do endosperma, acumulando-se posteriormente em corpos proteicos onde formam aglomerados proteicos (Krishnan *et al.* 1989; Taylor *et al.* 1985). A formação destes agregados é promovida pela maturação e pela secagem do grão (Oria *et al.* 1995).

Shull *et al.* (1991) partindo das semelhanças relativamente aos pesos moleculares, solubilidade e estrutura das prolaminas de sorgo (kafirinas) e de milho (zeinas), propuseram uma nomenclatura para as kafirinas baseada na nomenclatura já existente para as zeínas. As kafirinas foram, assim, classificadas em  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ . As kafirinas  $\alpha$  apresentam pesos moleculares de 23 e 25 kDa e são solúveis em solução de t-butanol de 40 a 90% na presença de 2-mercaptoetanol. As kafirinas  $\beta$  apresentam pesos moleculares de 16, 18 e 20 kDa e são solúveis em t-butanol de 10 a 60% na presença de 2-mercaptoetanol. Por sua vez, as kafirinas  $\gamma$  apresentam peso molecular de 28 kDa e são solúveis em t-butanol de 10 a 80% na presença de 2-mercaptoetanol.

As diferenças na solubilidade destes três tipos de kafirinas justificam-se pelas suas composições em aminoácidos. As kafirinas  $\alpha$ , que são extraídas apenas com elevadas concentrações de álcool, têm uma maior percentagem de aminoácidos hidrofóbicos como a fenilalanina, leucina e isoleucina. As kafirinas  $\beta$  apresentam uma menor percentagem destes aminoácidos, mas

são relativamente ricas em glicina (aminoácido hidrofílico). Desta característica resulta a sua extractibilidade com baixas concentrações de álcool. As kafirinas  $\gamma$ , por sua vez, contêm também níveis elevados dos aminoácidos hidrofílicos, como é o caso de glicina e histidina, e é por isso que são extraídas com baixas concentrações de álcool. Tanto as kafirinas  $\beta$  com as  $\gamma$  apresentam ainda quantidades elevadas de cisteína, o que favorece a formação de ligações dissulfeto intermoleculares (Shull *et al.* 1992).

Os corpos proteicos apresentam uma estrutura organizada onde as kafirinas assumem localizações bem definidas. Estudos imunocitoquímicos e de microscopia electrónica realizados por Shull *et al.* (1992), revelaram que nas regiões mais claras estão as kafirinas  $\alpha$  juntamente com pequenas quantidades de kafirinas  $\beta$  e  $\gamma$ . As regiões mais escuras contêm predominantemente kafirinas  $\beta$  e  $\gamma$ . Taylor (1984 b) verificou ainda que as inclusões existentes nos corpos proteicos são compostas por glutelinas e que a maioria das zonas escuras desaparece após extracção com solução alcoólica e agente redutor. Este dado revela que nas regiões escuras estão localizadas prolaminas interligadas por pontes S-S. Shull *et al.* (1992) verificaram ainda, que as kafirinas  $\alpha$  estão localizadas predominantemente no interior do corpo proteico, enquanto que as kafirinas  $\beta$  e  $\gamma$ , para além de se localizarem no interior, encontram-se maioritariamente à superfície dos corpos proteicos.

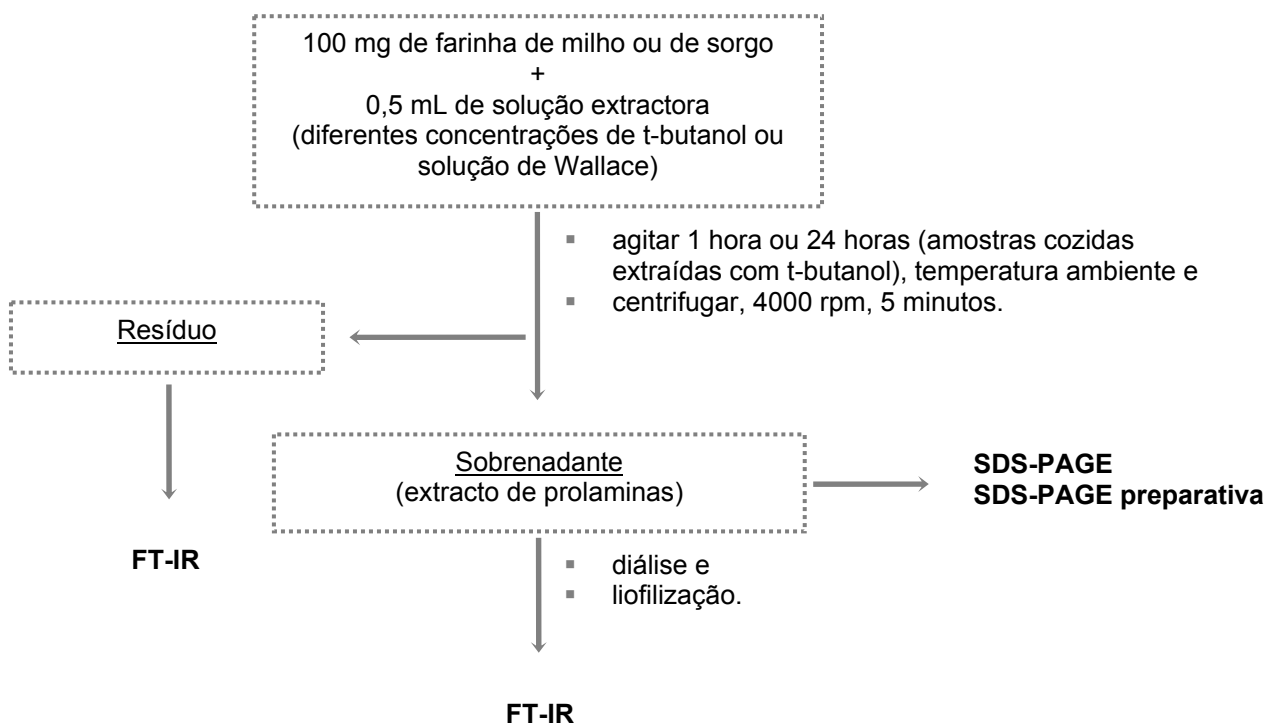
Independentemente do rendimento de extracção muitos estudos têm demonstrado que as kafirinas do sorgo podem ser divididas em duas fracções extractáveis: uma que pode ser extraída com solução alcoólica, denominadas kafirinas 1 ou kafirinas verdadeiras e outra, extraída do resíduo apenas com solução alcoólica e agente redutor, denominada glutelina solúvel em álcool (Jambunathan *et al.* 1975; Sastry *et al.* 1986), kafirina 2 (Mazhar e Chandrashekar, 1993) ou kafirina interligada (Guiragossian *et al.* 1978; Taylor *et al.* 1984 c; Oria *et al.* 1995).

El Nour *et al.* (1998) sugerem que essa diferença na solubilidade provém do facto das prolaminas extractáveis com agente redutor estarem presentes no endosperma na forma de polímeros de elevado peso molecular ligados por pontes dissulfeto, enquanto que as extractáveis apenas com álcool estão na forma de cadeias polipeptídicas simples. No mesmo estudo, a análise das

proteínas através de electroforese revelou que quando em condições não redutoras observa-se, para além das bandas correspondentes as kafirinas  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ , a presença de outras bandas correspondentes a polímeros de maior peso molecular. Ao efectuarem a mesma análise em condições redutoras, observaram que essas bandas de maior peso molecular desapareciam e que as outras de menor peso molecular se mantinham. Concluíram então que as kafirinas  $\gamma$ , que apresentam grandes quantidades de resíduos de cisteína, encontram-se ligadas às kafirinas  $\alpha$  formando polímeros de diferentes tamanhos e que estas duas proteínas apresentam a particularidade de formar pequenas estruturas ligadas por pontes dissulfeto. As kafirinas  $\beta$ , por sua vez, não aparecem na forma de oligómeros ou polímeros, o que permitiu aos autores concluírem que estas proteínas actuam como uma ponte que mantém ligados os oligómeros formados pelas kafirinas  $\alpha$  e  $\gamma$ , tornando-os muito grandes para serem extraídos em condições não redutoras.

## 6.2 Metodologia

- 1º Extracção das prolaminas com t-butanol.
- 2º Extracção com solução extractora de Wallace (Wallace *et al.* 1990).
- 2º Análise qualitativa e quantitativa dos extractos por SDS-PAGE.
- 3º Estudo dos extractos por FT-IR.
- 4º Estudo dos polímeros proteicos por SDS-PAGE preparativa.



**Figura 6.1:** Fluxograma referente ao processo de caracterização de prolaminas.

### 6.2.1 Extracção das prolaminas com t-butanol.

Através de ensaios preliminares verificou-se que os extractos de prolaminas poderiam ser efectuados directamente com solução alcoólica sem que se procedesse a uma extracção prévia com água e com solução salina.

De modo a estudar a hidrofobicidade das prolaminas efectuou-se um ensaio com diferentes concentrações de t-butanol. Para tal, testou-se um gradiente de 10 a 100% do referido álcool (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100%).

Para caracterização da fracção de prolaminas não reduzidas das amostras de farinha (Milho, NK283, KIW, KAT369 e PAN8569) efectuou-se uma extracção com t-butanol a 60%. As extracções decorreram com agitação magnética durante 1 hora à temperatura ambiente. Relativamente às amostras de farinha cozida, para que a extracção fosse eficiente houve necessidade de prolongar a extracção por 24 horas.

Todos os extractos obtidos com t-butanol foram analisados por SDS-PAGE.

### 6.2.2 Extracção com solução extractora de Wallace.

Este método baseia-se na extracção total das proteínas do grão, usando tampão borato a pH 10 com SDS a 1% e 2-mercaptoetanol a 2% (Wallace *et al.* 1990) e processa-se durante 1 hora à temperatura ambiente.

Uma vez que todas as proteínas do grão seriam extraídas, em ensaios preliminares efectuou-se uma extracção prévia das farinhas com tampão seguindo-se uma lavagem com água de forma a remover albuminas e globulinas. No entanto, uma vez que as prolaminas estão presentes na farinha em maior percentagem, verificou-se que a extracção directa com esta solução extractora conduzia a resultados similares. Por ser mais simples, optou-se, então pela extracção directa com a solução extractora.

Esta extracção decorre em meio redutor, portanto as ligações S-S que estão na origem dos aglomerados proteicos são quebradas, ficando os grupos S na forma S-H. A redução não é, no entanto, completa podendo observar-se, nos electroforegramas, a presença de algumas bandas na região acima dos 30 kDa (fora da região correspondente à presença de monómeros).

### 6.2.3 SDS-PAGE

A separação electroforética foi efectuada num sistema Mini Protean II (BioRad) em gel de poliacrilamida na presença de dodecil-sulfato de sódio como agente dissociante (Shewry *et al.* 1995). Ensaios preliminares revelaram que a composição ideal do gel para caracterização deste tipo de amostras seria: 15% de acrilamida e 0,4% de bis-acrilamida em Tris/HCl 1,5 M, pH 8,8, na presença de SDS 0,1% (m/v). O gel concentrador era constituído por 4% de acrilamida e 0,4% de bis-acrilamida em Tris/HCl 0,5 M, pH 6,8 na presença de SDS 0,1% (m/v). A polimerização dos géis foi iniciada com N,N,N',N'- tetrametiletilenodiamina (TEMED) 42,5 mM e catalisada por persulfato de amónio (APS) 0,05% (m/v).

A separação electroforética decorreu durante 60 minutos a 170 V (fonte BioRad Power-Pac 300) em solução de Tris 25 mM, glicina 0,192 M, pH 8,3 e SDS 0,1%.

Para análise dos extractos de t-butanol houve necessidade de secar previamente 60 µL do extracto sob corrente de azoto, o resíduo obtido foi redissolvido em 10 µL de tampão amostra (solução desnaturante constituída por Tris 62,5 mM, SDS 2% (m/v), glicerol 10% (v/v), azul de bromofenol 0,01% (m/v)). Para estudos em condições redutoras, na altura da análise, foi adicionado 2-mercaptoetanol 1%. Quer em condições redutoras como em condições não redutoras foram aplicados no gel 7µL.

Para os extractos de t-butanol correspondentes às amostras de sorgo cozidas verificou-se que para obter resultados similares aos das amostras cruas, seria necessário concentrar 160 µL de extracto e aplicar no gel 10 µL da mistura.

No caso dos extractos de Wallace, a 30 µL de amostra foi adicionado igual volume de tampão de amostra.

Antes das amostras (extracto + tampão amostra) serem aplicadas no gel foram fervidas 5 minutos para promover a sua desnaturação.

Os géis foram revelados com azul de Coomassie (R 250); foi efectuada com uma solução deste corante a 0,25% (p/v) em metanol 25% (v/v) e ácido acético 5% (v/v). Após a separação electroforética os géis foram colocados num recipiente contendo a solução de coloração durante 30 minutos. A descoloração efectuou-se com uma solução de composição semelhante à descrita anteriormente, mas na ausência de corante.

#### 6.2.4 Obtenção do perfil electroforético

De forma a proceder à análise quantitativa dos géis de SDS-PAGE os perfis electroforéticos foram digitalizados e as imagens tratadas de acordo com o procedimento descrito no Capítulo 5.

Após a obtenção dos perfis electroforéticos, e para cada banda electroforética de interesse, foi determinado o peso molecular exacto e foi também calculada a área correspondente.



### 6.2.5 SDS-PAGE preparativa

Após a obtenção dos electoforegramas correspondentes às amostras de prolaminas extraídas com t-butanol, as bandas electroforéticas de interesse (nomeadamente as correspondentes aos aglomerados de elevados peso molecular) foram cortadas e colocadas em porta amostras de 0,5 mL. As bandas foram posteriormente lavadas com 40% metanol e 10% de ácido acético até que a cor azul, correspondente ao Azul de Coomassie, desaparecesse totalmente. Depois de totalmente descoradas as bandas foram moídas e submetidas a uma extracção com tampão extractor (0,1% de SDS, 0,5 M de Tris, 1 mM de EDTA e 5 mM de DTT - Watterson *et al.* 1993). Após 24 horas, os extractos foram separados dos pedaços de gel e analisados por SDS-PAGE (condições electroforéticas similares às descritas em 6.2.3) As concentrações das amostras para análise por SDS-PAGE foram ajustadas para cada amostra).

Desta vez, devido à diminuta quantidade de proteína, houve necessidade em revelar os géis com prata. A coloração com azul de Coomassie é utilizada quando se têm quantidades de proteína de cerca 1 µg por banda electroforética e a coloração com nitrato de prata é aplicada para revelação de quantidades de proteína de cerca 0,1 µg por banda (Shewry *et al.* 1995).

Para a revelação seguiu-se um método rápido descrito por Moreno *et al.* (1995). Os géis foram colocados numa solução fixante (40% de metanol e 13,5% de 37% de formaldeído em água) durante 5 minutos. Após este passo, foram colocados, durante 20 segundos, numa solução de 0,02% de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ . Depois de duas lavagem rápidas com água foram colocados, durante 10 minutos, numa solução de 0,1% de  $\text{AgNO}_3$ . Em seguida foram lavados com água para depois serem colocados na solução de revelação (3%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 0,05% de 37% de formaldeído e 0,000016% de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) até ao aparecimento das bandas electroforéticas. A revelação foi parada por adição de solução 2,3 M de ácido cítrico (até 10% do volume total da solução de revelação). Os géis foram depois preservados em água até serem digitalizados.

## 6.2.6 Ensaaios de FT-IR

Os espectros dos extractos proteicos e dos resíduos amiláceos obtidos após a extracção foram adquiridos na gama de 4000 a 500  $\text{cm}^{-1}$  (gama de infravermelho médio) com resolução de 8  $\text{cm}^{-1}$  num espectrómetro Bruker IFS 55 com acessório Golden Gate (sistema de ATR de reflexão única), com acumulação de 256 scans. Foram realizadas cinco réplicas de cada amostra.

## 6.3 Resultados e discussão

### 6.3.1 Análise qualitativa e quantitativa dos extractos de prolaminas

As técnicas electroforéticas para além de servirem para análise qualitativa podem ser de grande auxílio quando se pretende efectuar uma análise quantitativa. Para tal basta obter os perfis electroforéticos e proceder à medição das áreas correspondentes das bandas electroforéticas de interesse.

#### 6.3.1.1 Estudo da hidrofobicidade das prolaminas

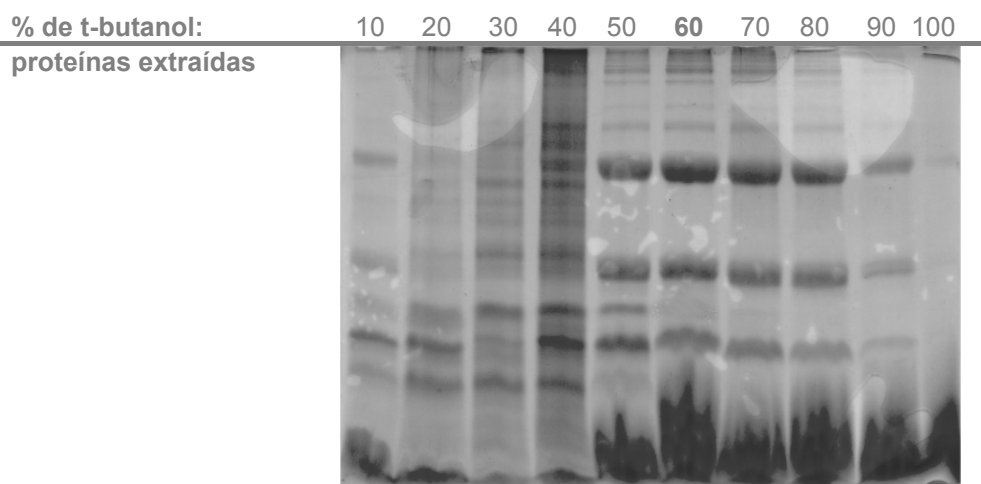
Recorrendo a uma extracção das proteínas da farinha de sorgo com soluções de concentração crescente em t-butanol pode inferir-se a hidrofobicidade das proteínas que são extraídas.

Na Figura 6.2 estão apresentados os resultados obtidos para as farinha de sorgo da variedade NK283.

Pode verificar-se que o perfil correspondente às prolaminas começa a estar presente nos géis de SDS-PAGE quando a extracção se processa com, no mínimo, 50% de t-butanol. Quando se utilizam concentrações inferiores de solvente orgânico, e consequentemente maior concentração de água, a natureza hidrofóbicas das kafirinas não permite a sua extracção.

Quando se passa de 50 para 60% de t-butanol pode verificar-se, para além dum incremento notório na intensidade das bandas electroforéticas, o desaparecimento de uma banda localizada a 21 kDa. A inexistência dessa proteína no trilho electroforético correspondente ao extracto de 60% de t-butanol denota uma hidrofobicidade diferente das prolaminas extraídas com essa concentração de solvente. Uma vez que na literatura, e por definição, as prolaminas de sorgo são as proteínas extraídas da farinha com 60% de t-butanol, a referida proteína não foi considerada para o estudo da fracção de prolaminas do sorgo.

Há medida que a concentração de t-butanol aumenta, a eficiência da extracção permanece inalterada até se atingir a concentração de 90%. Nesta altura, a extracção das prolaminas diminui significativamente até ser inexistente com 100% de t-butanol. De acordo com este estudo não se detectaram diferenças de extracção para as prolaminas  $\gamma$  e  $\alpha$  não se podendo, então, inferir acerca das sua hidrofobicidade, tal como foi efectuado por Shull *et al.* 1992. Relativamente às kafirinas  $\beta$ , estas parecem ser menos hidrofóbicas que as restantes kafirinas, isto porque a sua extracção começa com t-butanol a 40%.



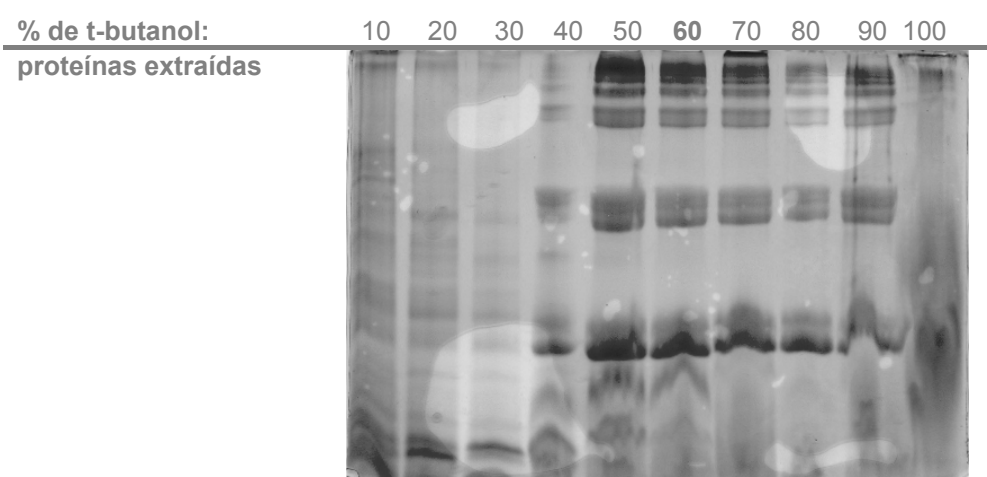
**Figura 6.2:** Extracção com gradiente de t-butanol (de 10 a 100%) a farinha de sorgo da variedade NK283.

A partir de 50% de t-butanol começa a estar presente uma banda de contorno irregular a região inferior do gel, essa banda tem vindo a ser

associada à presença de compostos fenólicos na amostra. Estes compostos podem estar a ser removidos da farinha aquando da extracção ou então podem estar associados às proteínas e serem delas libertados no decorrer da análise electroforética (Figura 6.2).

O comportamento das restantes variedades de sorgo estudadas (KLW, KAT369 e PAN8569) é equivalente ao da variedade NK283, portanto não se julgou relevante a apresentação do referido electroforegrama.

No que diz respeito ao milho os resultados são apresentados na Figura 6.3 e pode verificar-se que são um pouco distintos dos do sorgo.



**Figura 6.3:** Extracção com gradiente de t-butanol (de 10 a 100%) a farinha de milho.

Para além de menor concentração nos presumíveis compostos fenólicos e da referida proteína de 21 kDa ser inexistente, a extracção das zeínas começa a ser efectuada com concentrações inferiores de t-butanol. O facto das prolaminas de milho começarem a ser extraídas com concentrações inferiores de t-butanol significa que a sua hidrofobicidade é inferior às do sorgo (Figura 6.3).

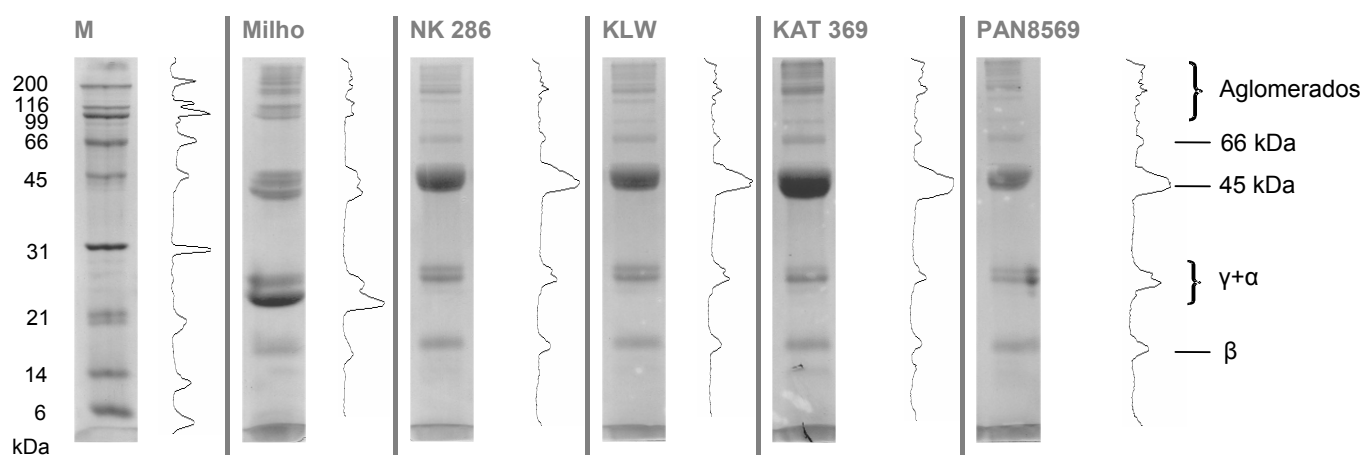
Este estudo comprova que a hidrofobicidade das prolaminas de sorgo e de milho são distintas. Sabendo que a hidrofobicidade é uma característica associada à redução dos valores da digestibilidade das proteínas de sorgo cozido e que o cozimento não afecta a digestibilidade das proteínas de milho, a natureza hidrofóbica das kafiinas pode explicar parcialmente a redução dos valores de digestibilidade aquando do cozimento.

### 6.3.1.2 Extractos obtidos com t-butanol

Quando se pretende efectuar uma análise electroforética ao extracto total, e de forma a preservar os oligómeros proteicos que, na sua composição estabelecem ligações S-S, não se podem empregar condições redutoras. Para tal, pode recorrer-se à extracção com solução alcoólica. De acordo com os resultados apresentados na secção anterior, e confirmando estudos anteriores (Taylor *et al.* 1994 a), a solução mais apropriada para extracção será t-butanol 60%.

- a partir de amostras cruas

Na Figura 6.4 são apresentados os electroforegramas de todas as variedades de farinha estudadas e respectivos perfis electroforéticos. Uma primeira análise permite-nos observar que a composição de todos os extractos é bastante similar.



**Figura 6.4:** Electroforegramas de prolaminas extraídas de farinha crua com t-butanol. Os perfis electroforéticos são apresentados junto de cada electroforegrama.

A análise das amostras em géis homogéneos de 15% foi efectuada com o objectivo de obter uma caracterização do extracto proteico total - análise quantitativa. Foram empregues condições não redutoras para que os oligómeros fossem estudados intactos. Os perfis electroforéticos obtidos, a

partir de cada imagem do gel, permitem uma análise quantitativa do extracto de prolaminas.

Após determinação exacta dos pesos moleculares das bandas electroforéticas pode verificar-se que a amostra de milho apresenta na sua composição aglomerados de elevado peso molecular (200-80 kDa), oligómeros a 45 e 42 kDa, assim como monómeros  $\gamma$  (28 kDa),  $\alpha$  (24 kDa) e  $\beta$  (19 kDa). Os pesos moleculares apresentados foram calculados por comparação com a mobilidade de marcadores proteicos de peso molecular conhecido e seguindo a metodologia descrita no Capítulo 5.

Os pesos moleculares determinados para as kafirinas foram um pouco distintos: os aglomerados de elevado peso molecular encontram-se distribuídos entre 200 – 80 kDa, os oligómeros apresentam pesos moleculares de 66 kDa e 45 kDa e os monómeros de 31 kDa ( $\gamma$ ), 29 kDa ( $\alpha$ ) e 17 kDa ( $\beta$ ).

Pode então verificar-se que no sorgo está presente um oligómeros de 66 kDa que não foi detectado no milho. Por sua vez, no sorgo não está presente um oligómero de 42 kDa que foi detectado no milho. Em relação aos pesos moleculares dos monómeros, pode verificar-se que apresentam algumas oscilações.

Para além destas diferenças, quando se procede a uma análise quantitativa pode verificar-se que a percentagem de cada componente varia de variedade para variedade.

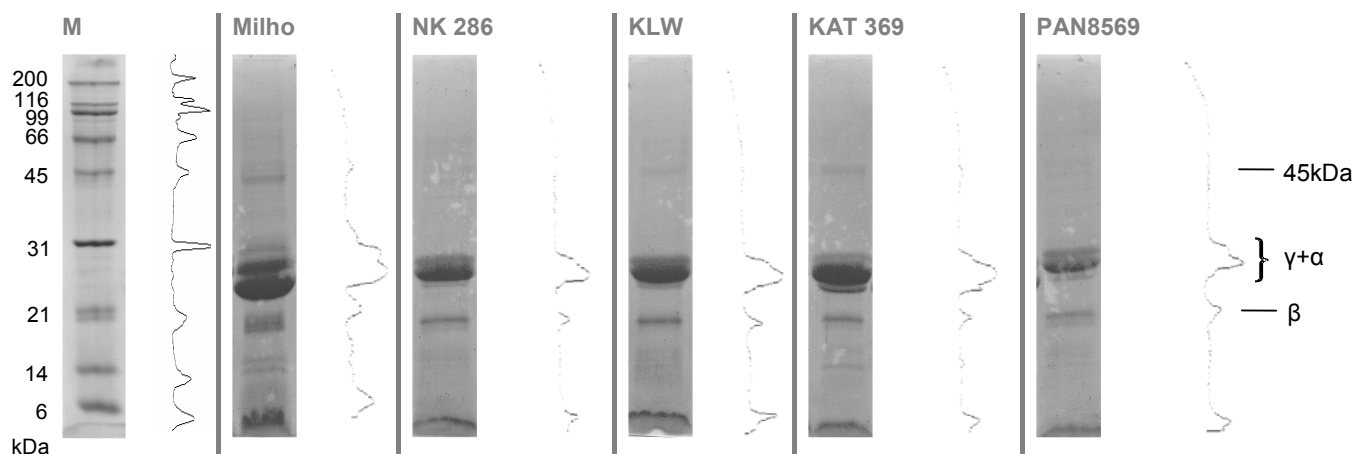
**Tabela 6.1:** Composição quantitativa das prolaminas de milho e de sorgo.

	Milho	NK 283	KLW	KAT 369	PAN 8569
<b>HMW</b>	23,6%	14,8%	19,6%	22,6%	23,3%
<b>66 kDa</b>	-	3,6%	3,5%	4,0%	2,9%
<b>45 kDa</b>	21,7%	50,4%	46,2%	54,6%	36,3%
<b><math>\gamma + \alpha</math></b>	46,1%	20,4%	20,8%	11,0%	25,8%
<b><math>\beta</math></b>	8,6%	10,8%	9,8%	7,8%	11,7%

Na Tabela 6.1 estão apresentados as percentagens relativas de cada constituinte electroforético. Os constituintes mais abundantes no milho são os monómeros  $\gamma+\alpha$ . No caso das kafirinas o constituinte mais abundante é o oligómero de 45 kDa. De acordo com a mesma tabela o componente minoritário das kafirinas é o oligómero de 66 kDa e, no que diz respeito às zeínas, esse componente é o monómeros  $\beta$ .

Se os géis são realizados em condições redutoras; ou seja se às amostras estudadas for adicionado 2-mercaptoetanol as ligações S-S clivam e os oligómeros são dissociados. Então o gel obtido revela os constituintes dos oligómeros. Os géis obtidos nessas condições estão apresentados na Figura 6.5.

Pode verifica-se que apenas quantidades vestigiais de oligómeros (45 e 42 kDa) resistem à redução. No que diz respeito aos monómeros, há um incremento acentuados dos monómeros  $\gamma$ ,  $\alpha$  e  $\beta$  e pode ainda detectar-se a presença de dois outros monómeros ainda não identificados: um a 14 kDa e outro a 6 kDa.



**Figura 6.5:** Electroforegramas de prolaminas extraídas de farinha crua, com t-butanol, após redução. Os perfis electroforéticos são apresentados junto de cada electroforegrama.

Com este tipo de ensaio, em condições redutoras, comprova-se que os oligómeros são constituídos por monómeros que estabelecem ligações S-S, no entanto este procedimento não permite a caracterização de cada um dos oligómeros (HMW, 66 kDa, 45 kDa) isoladamente, uma vez que são todos

reduzidos simultaneamente. De forma a caracterizar os oligómeros isoladamente há que aplicar técnicas electroforéticas preparativas.

Na Tabela 6.2 estão resumidas as observações efectuadas a partir da Figura 6.5 e, simultaneamente, é apresentada a composição quantitativa dos valores referentes aos diversos constituintes da fracção de prolaminas quando estas são estudadas em meio redutor.

**Tabela 6.2:** Composição qualitativa das prolaminas de milho e sorgo, após redução.

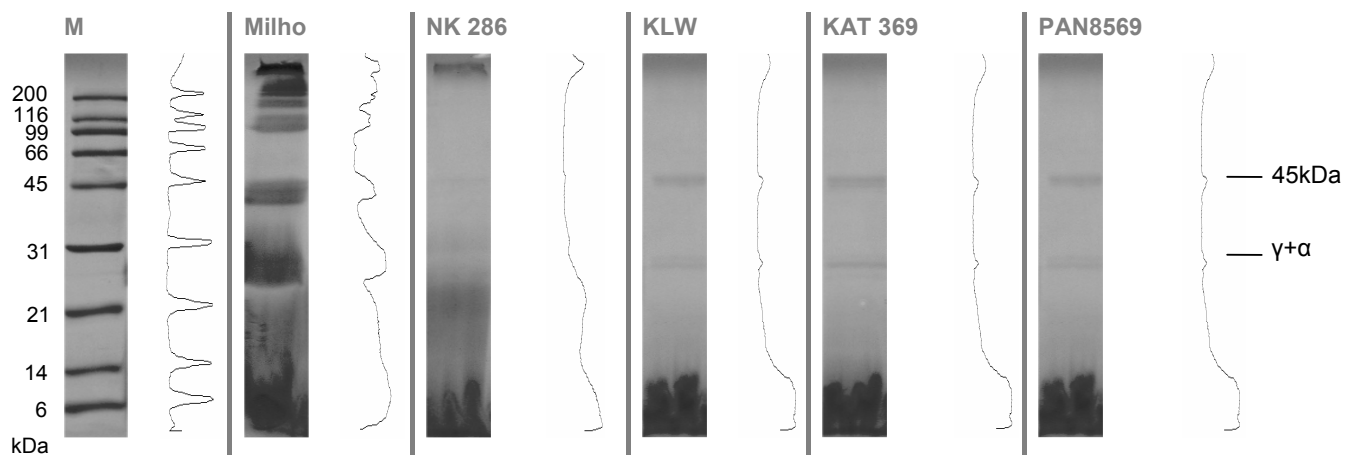
	Milho	NK 283	KLW	KAT 369	PAN 8569
HMW	-	-	-	-	-
66 kDa	-	-	-	-	-
45 kDa	2.38%	2.46%	1.64%	3.10%	1.86%
$\gamma + \alpha$	84.52%	85.86%	86.54%	87.93%	86.96%
$\beta$	13.10%	11.68%	11.82%	8.98%	11.18%

Tal como tinha sido verificado por observação directa da Figura 6.5, e por comparação com os valores tabelados em 6.1, verifica-se o desaparecimento das bandas correspondentes aos HMW e 66 kDa. As bandas localizadas a 45 kDa diminuem drasticamente enquanto que se verifica um incremento dos monómeros  $\gamma$  e  $\alpha$ . No que diz respeito aos monómeros  $\beta$ , não se verifica um incremento com a redução. Esta observação pode estar relacionada com o facto deste monómero não se encontrar a fazer parte dos aglomerados de elevado peso molecular, nem dos oligómeros de 66 kDa, nem sequer da fracção de oligómeros de 45 kDa que resistem à redução. Esta observação contraria os resultados obtidos por El Nour *et al.* (1998) que mostraram a presença de pequenas quantidades de monómero  $\beta$  na composição dos aglomerados de elevado peso molecular.



- a partir de amostras cozidas

No que diz respeito à análise dos extractos correspondentes às amostras de farinha cozida procedeu-se de forma similar mas a extracção com t-butanol 60% durante 1 hora. No entanto, este tempo de extracção não foi suficiente, como se pode observar pelos electroforegramas dos extractos apresentados na Figura 6.6.



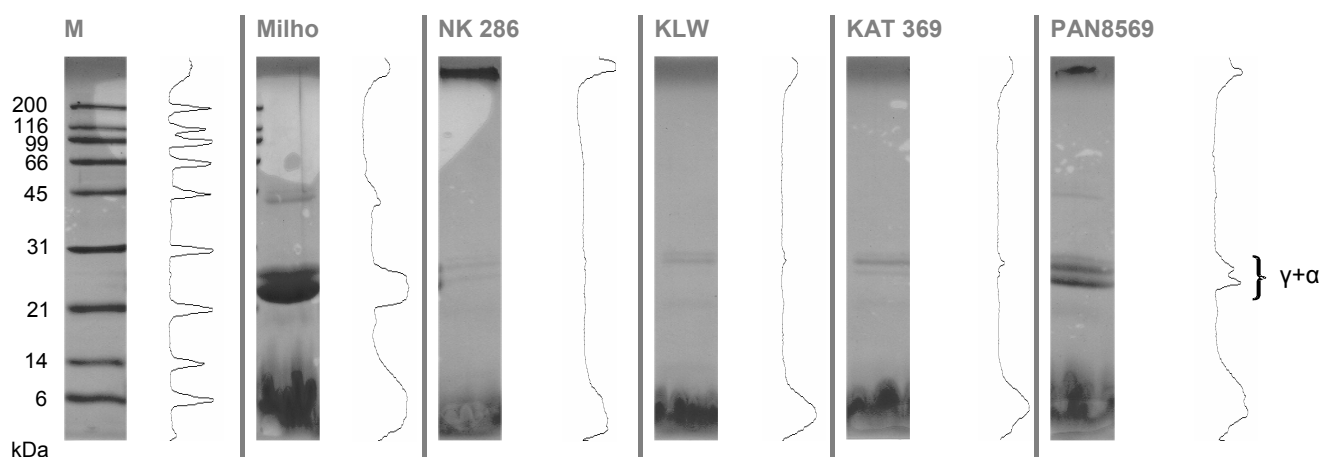
**Figura 6.6:** Electroforegramas de prolaminas extraídas de farinha cozida com t-butanol (1 hora de extracção). Os perfis electroforéticos são apresentados junto de cada electroforegrama.

Como se pode verificar, a extracção foi insuficiente para as amostras de sorgo cozido.

Enquanto que a intensidade das bandas electroforéticas da amostra de milho cozido é comparável à amostra crua, nas amostras de sorgo notam-se, apenas, algumas bandas electroforéticas na região dos 45 kDa e na região dos monómeros  $\gamma + \alpha$ . Perante estes resultados, poderá tratar-se da formação de aglomerados de elevado peso molecular aquando do cozimento da farinha de sorgo que não entram na malha do gel ou então pode tratar-se de um problema de acessibilidade do solvente aos corpos proteicos, devido ao amido gelatinizado.

No que diz respeito à primeira hipótese, a presença de agente redutor faz desaparecer a banda electroforética correspondente ao oligómero de 45 kDa

e como consequência pode detectar-se um pequeno incremento dos monómeros  $\gamma$  +  $\alpha$ . Este pequeno incremento não é compatível com a presença de aglomerados. Se estes estivessem presentes nas amostras as bandas referentes aos monómeros aumentariam bastante mais (Figura 6.7).



**Figura 6.7:** Electroforegramas de prolaminas extraídas de farinha cozida, com t-butanol, durante 1 hora, após redução. Os perfis electroforéticos são apresentados junto de cada electroforegrama.

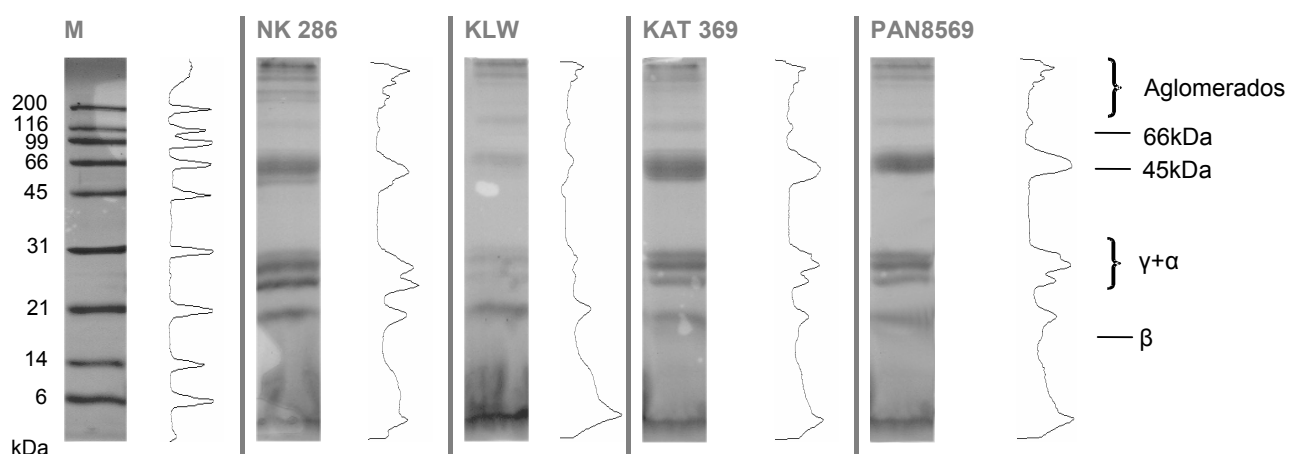
Claro que os aglomerados proteicos originados pelo cozimento podem ser formados por outras ligações que não as pontes dissulfeto (S-S) e nesse caso a presença de agente redutor não teria qualquer efeito sobre eles.

No que diz respeito à segunda hipótese proposta, Bach Knudsen *et al.* (1988) sugerem que na base da deficiente digestibilidade proteica do sorgo cozido poderia estar o problema do difícil acesso das enzimas proteolíticas aos corpos proteicos. Aquando da gelatinização do amido poderia ocorrer a formação de complexos amido – proteína. Esses complexos dificultariam o acesso da solução extractora (tal como ocorre com as enzimas) aos corpos proteicos e, consequentemente, a extracção das prolaminas seria insuficiente.

Para as amostras de sorgo testou-se, uma extracção mais prolongada, durante 24 horas. Os géis obtidos são apresentados na Figura 6.8.

Pode verificar-se pela presença de bandas electroforéticas pouco intensas que, mesmo após 24 horas, a extracção não é totalmente eficiente. No entanto, foi possível estabelecer a composição das prolaminas de sorgo

cozido, verificando-se ser similar à das amostras cruas. Pode detectar-se a presença de aglomerados de elevado peso molecular, oligómeros a 66 e 45 kDa assim como os monómeros  $\gamma$ ,  $\alpha$  e  $\beta$ . A intensidade das referidas bandas electroforéticas é inferior no caso das amostras cozidas, uma vez que, como foi referido anteriormente, a extracção é deficiente, provavelmente devido à presença de amido gelatinizado. Assim sendo, a hipótese da deficiente acessibilidade parece ser a mais correcta.

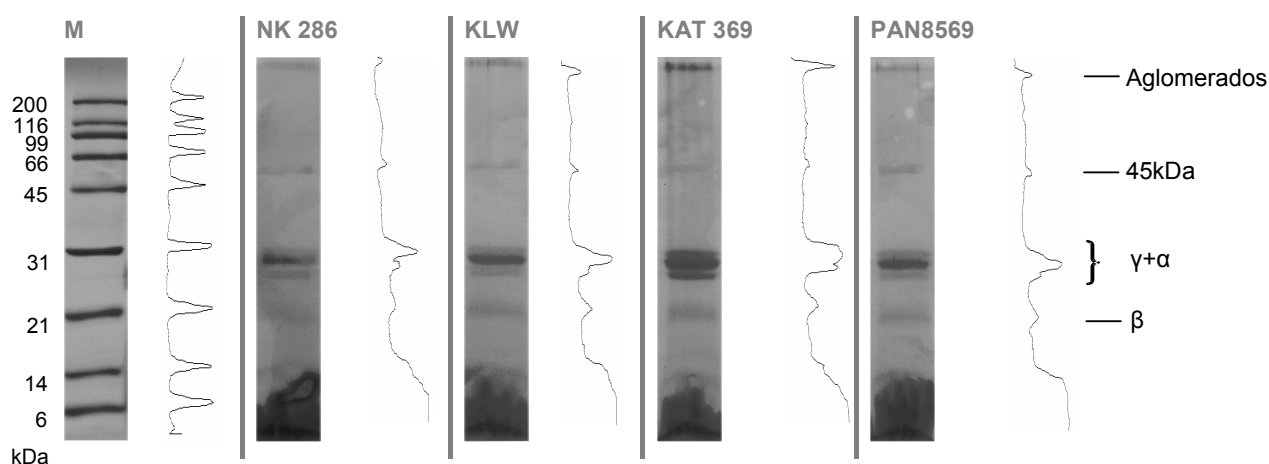


**Figura 6.8:** Electroforegramas de prolaminas extraídas de farinha cozida, com t-butanol, durante 24 horas. Os perfis electroforéticos são apresentados junto de cada electroforegrama.

Quando estudamos os extractos na forma reduzida pode verificar-se que paralelamente ao incremento das bandas correspondentes aos monómeros verifica-se o desaparecimento dos aglomerados de elevado peso molecular e do oligómero de 66 kDa. Em relação ao oligómero de 45 kDa, a sua intensidade diminui acentuadamente mas não desaparece na totalidade. No topo do gel, região referente às proteínas de elevado peso molecular, parece existir uma banda electroforética. As proteínas aí localizadas não foram detectadas no gel realizado em condições não redutoras e parecem resultar da clivagem de grandes aglomerados originados aquando do cozimento e que em condições não redutoras não conseguem entrar na malha do gel. Após redução, as suas dimensões diminuem e conseguem ser parcialmente detectados no gel. No entanto, devido à sua elevada dimensão não entram totalmente na malha do gel. Estas observações parecem vir a confirmar a

primeira hipótese proposta anteriormente acerca do efeito do cozimento na formação de aglomerados de elevado peso molecular que apresentam dimensões tais que não podem entrar na malha do gel de SDS-PAGE.

Uma vez que, nestas amostras, a extracção não é completa não parece conveniente efectuar análise quantitativa destes extractos e consequentemente comparações entre o perfil electroforético destas amostras e o perfil das correspondentes amostras cruas parece inadequado (Figura 6.9).

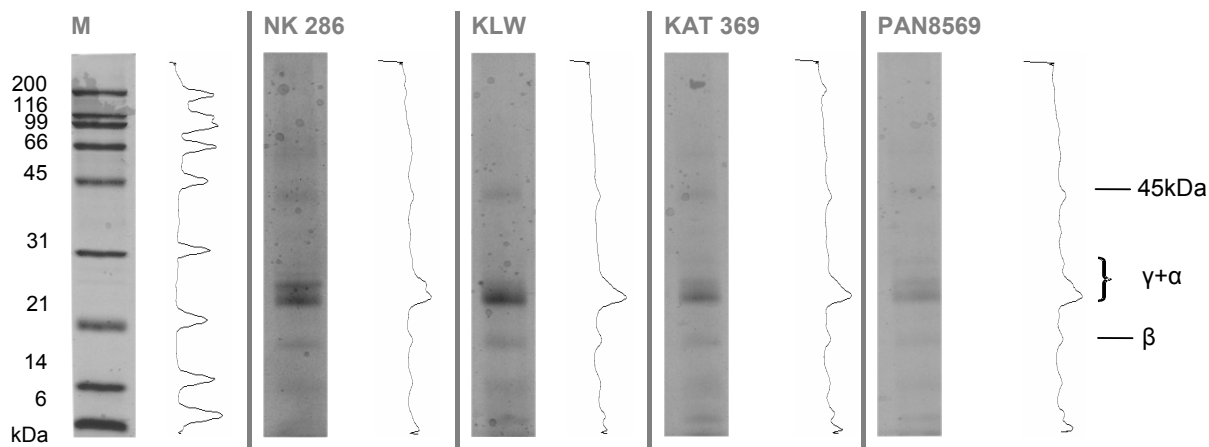


**Figura 6.9:** Electroforegramas de prolaminas extraídas de farinha cozida, com t-butanol, durante 24 horas e em condições redutoras. Os perfis electroforéticos são apresentados junto de cada electroforegrama.

De forma a perceber quais as proteínas que permaneceram no resíduo amiláceo após extracção com t-butanol 60% (24 horas), procedeu-se a uma segunda extracção com solução de Wallace. Os resultados estão apresentados na Figura 6.10.

Como se pode verificar, os perfis electroforéticos das quatro variedades de sorgo são similares. Para além dos monómeros  $\gamma$ ,  $\alpha$  e  $\beta$  pode também ser detectado o oligómero de 45 kDa.

Este oligómero que está presente nos extractos proteicos e que resiste às condições redutoras da solução de Wallace, pode corresponder ao oligómero de 45 kDa presente no extracto de t-butanol e que também resiste à redução.



**Figura 6.10:** Electroforegramas de prolaminas extraídas de farinha cozida, com solução de Wallace, durante 1 hora após extracção com t-butanol 60%. Os perfis electroforéticos são apresentados junto de cada electroforegrama.

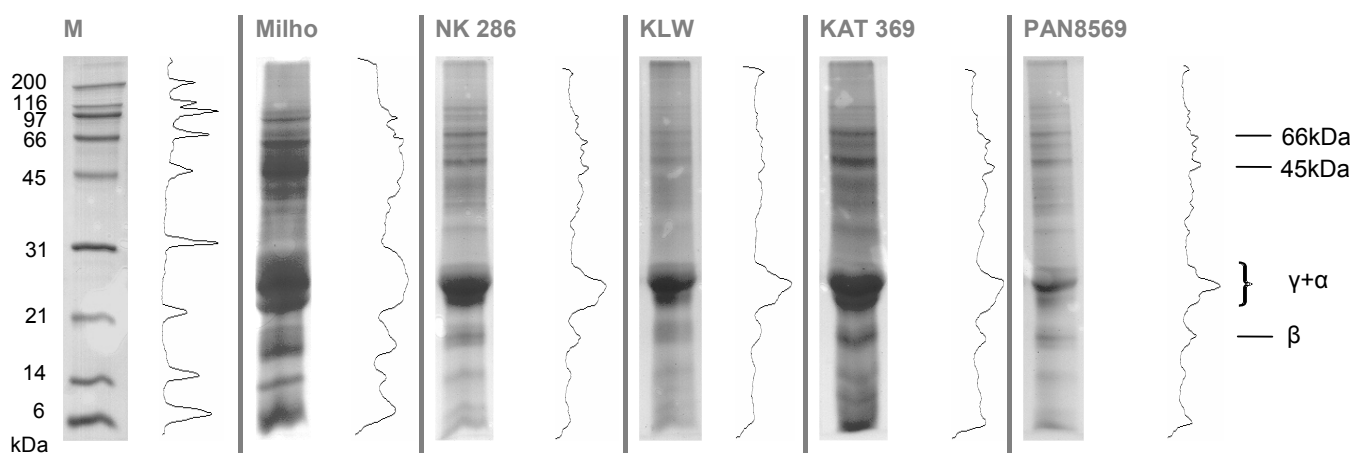
Uma vez que esta segunda extracção foi desenvolvida em meio redutor, é possível que no resíduo amiláceo os monómeros  $\gamma$  e  $\alpha$  estejam a estabelecer ligações S-S, clivadas aquando da extracção na presença de agente redutor.

### 6.3.1.3 Extractos obtidos com solução de Wallace

Na extracção de Wallace foram empregues condições redutoras, consequentemente os aglomerados proteicos, formados através de pontes S-S e que foram previamente identificados em 6.3.1.1 (aquando da extracção com t-butanol), não são detectados nos electroforegramas correspondentes a este tipo de extractos.

- a partir de amostras cruas

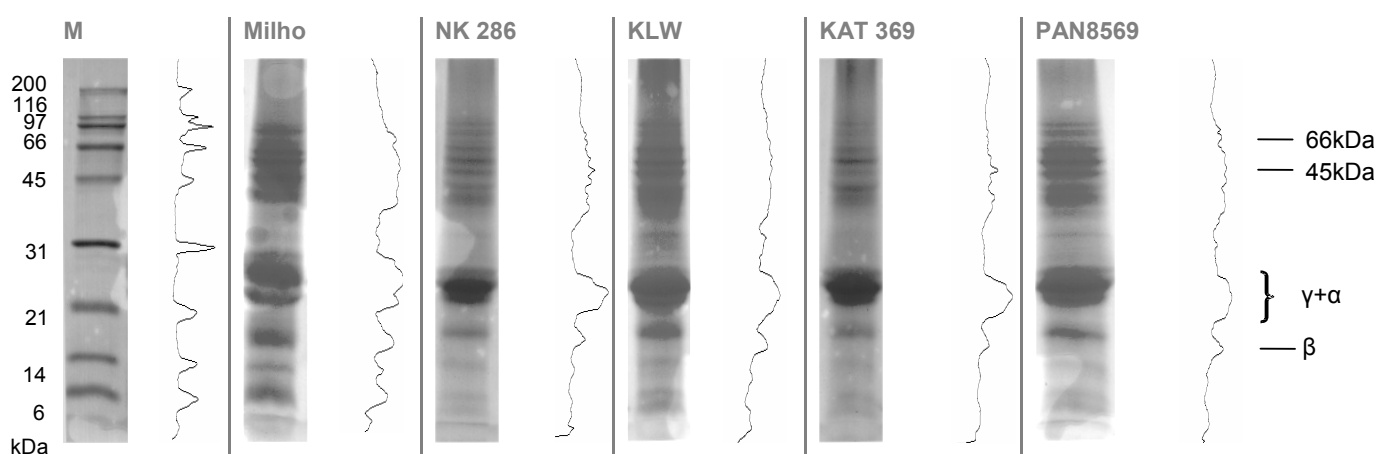
Como se pode verificar por observação da Figura 6.8, para além de terem sido empregues condições redutoras, aquando da extracção, a redução não é completa.



**Figura 6.11:** Electroforegramas de prolaminas extraídas de farinha crua, com solução de Wallace. Os perfis electroforéticos são apresentados junto de cada electroforegrama.

Isto porque podem ser detectadas bandas electroforéticas entre 97 e 45 kDa, sendo as bandas de 66 e 45 kDa as mais evidentes. A redução originou um incremento da intensidade das bandas electroforéticas correspondentes aos monómeros proteicos  $\gamma$ ,  $\alpha$  e  $\beta$ .

- a partir de amostras cozidas



**Figura 6.12:** Electroforegramas de prolaminas extraídas de farinha cozida, com solução de Wallace. Os perfis electroforéticos são apresentados junto de cada electroforegrama.

Comparando este tipo de extracção com a extracção com t-butanol, pode verificar-se que com esta solução de extracção, e para iguais tempos de extracção, consegue extrair-se mais proteína de elevado peso molecular.

Os perfis electroforéticos referentes às prolaminas extraídas das farinhas cozidas não diferem grandemente dos perfis referentes às amostras cruas, nota-se apenas incremento no que diz respeito às proteínas de peso molecular mais elevado. Este incremento poderá estar relacionado com um aumento da resistência desses oligómeros à redução, resistência essa ocasionada pelo cozimento (Figura 6.9).

Os dois tipos de extracção abordados neste capítulo poderão fornecer informação complementar. Na extracção com t-butanol consegue efectuar-se uma caracterização global da amostra; oligómeros com diferentes pesos moleculares podem ser identificados e submetidos a electroforese preparativa para se proceder à sua caracterização. A extracção de Wallace mostrou ser mais eficaz, permitindo a obtenção de um extracto representativo das prolaminas do grão. A eficiência de cada uma das extracções será abordada na secção seguinte.

### 6.3.2 Estudo dos extractos por FT-IR

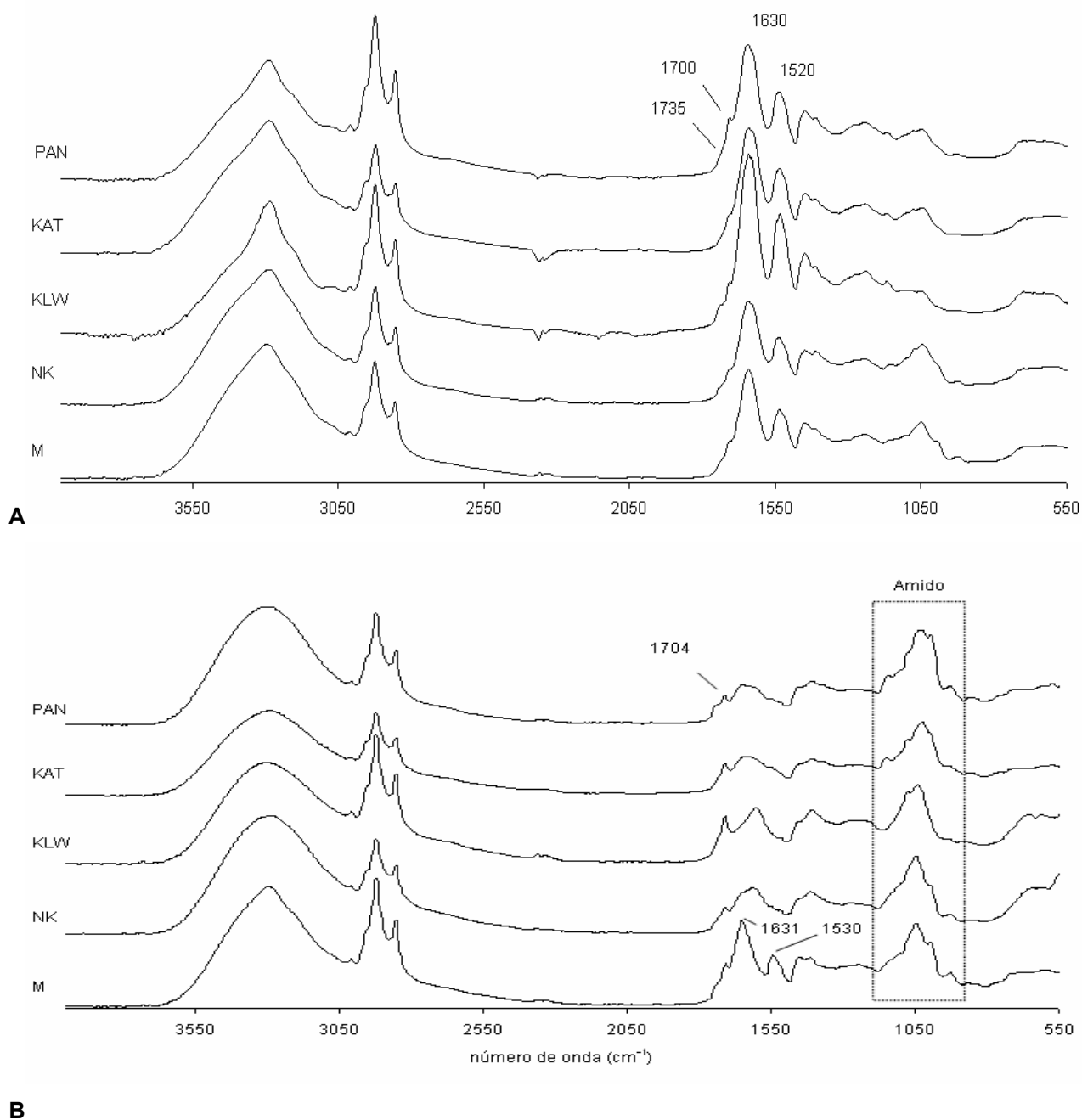
De forma a efectuar uma caracterização imediata da composição dos extractos de prolaminas adquiriram-se os respectivos espectros de FT-IR após diálise e liofilização.

#### 6.3.2.1 Extracção com t-butanol

- extractos proteicos

No que diz respeito às prolaminas extraídas de farinha crua com t-butanol 60%, o espectro mostra que a proteína é o componente maioritário, como se pode verificar pela presença dos picos Amida I e II localizados a, aproximadamente, 1630 e 1520  $\text{cm}^{-1}$ . A presença de ombros a 1735 e 1700  $\text{cm}^{-1}$  pode ser indicadora da existência de compostos fenólicos e/ou ácidos

gordos na amostra. Estes compostos apresentam grande afinidade pelas prolaminas (Spencer *et al.* 1988) e pelo solvente em causa (Figura 6.12 A).



**Figura 6.13:** Espectros de FT-IR dos extractos de prolaminas obtidos por extracção com solução de t-butanol 60% a partir de farinha crua (**A**) e a partir de farinha cozida (**B**).

Quando a extracção é efectuada em farinhas de sorgo cozidas os sinais referentes à presença de proteínas são mais largos e de menor intensidade,



estando, em alguns casos, o sinal correspondente à Amida II sobreposto com o da Amida I. O facto de existir pouca proteína nos extractos obtidos a partir de farinhas de sorgo cozidas tinha sido já verificado por SDS-PAGE. No que diz respeito às amostras de prolaminas de milho, as bandas das Amidias I e II são de intensidade similar às das prolaminas de milho cruas, verifica-se apenas um deslocamento dos máximos desses sinais, ocupando agora posições mais à esquerda do espectro: a  $1640$  e  $1530\text{ cm}^{-1}$ . Podendo indicar alterações conformacionais.

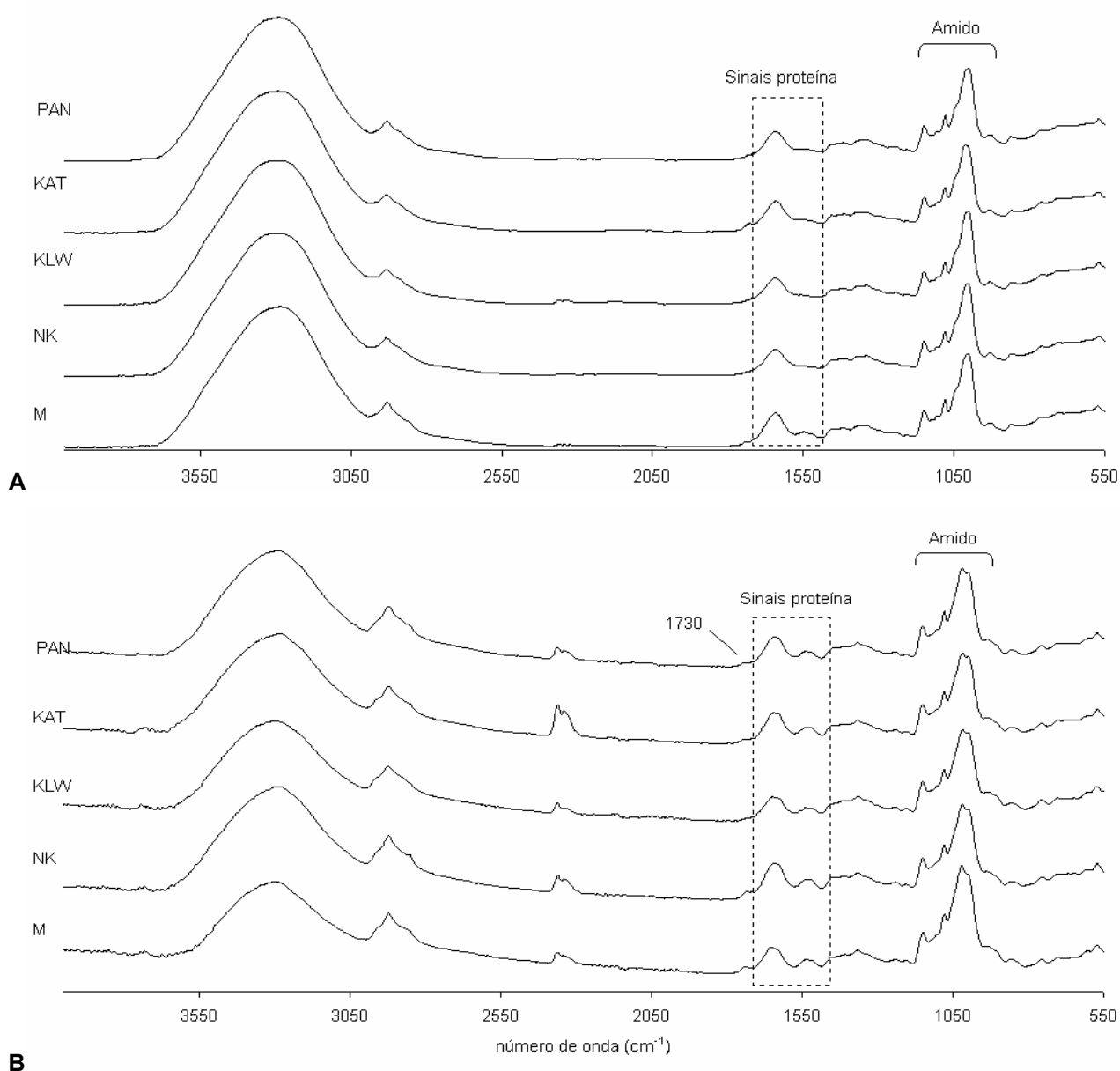
Nos espectros de prolaminas extraídas a partir de farinha cozida (principalmente na variedade KWL) é, também, detectada a presença de um sinal a  $1704\text{ cm}^{-1}$ , este sinal pode estar associado quer à presença de ácidos gordos quer de compostos fenólicos. Nestes espectros este sinal é mais evidente que no caso dos espectros de farinha crua, possivelmente devido a efeitos de concentração, uma vez que os sinais das proteínas são menos intensos.

A particularidade mais relevante da informação contida nestes espectros assenta na presença de sinais na região da *impressão digital*. Esses sinais são indiscutivelmente associados à presença de amido nas amostras. A extracção com t-butanol 60% aplicada às amostras de farinha cozida para além de extrair proteínas (prolaminas) e alguns compostos fenólicos extrai ainda algum amido. Esta presença poderá estar associada a complexos proteína-amido formados aquando do cozimento (Bach Knudsen *et al.* 1988), contudo não se descarta a hipótese de algum amido solubilizado ter sido arrastado pelo extractante. Este comportamento foi detectado tanto em farinhas de sorgo e como de milho (Figura 6.12 B).

- resíduos amiláceos

A deficiente extractabilidade proteica das farinhas de sorgo cozida pode também ser comprovada pela análise dos espectros de FT-IR dos resíduos amiláceos que ficaram após a extracção de prolaminas. Quando se observam os espectros dos resíduos após extracção da farinha crua nota-se o desaparecimento do sinal correspondente à Amida II podendo concluir-se

que a proteína é extraída quase na totalidade. O resíduo mais rico em proteína é o correspondente à farinha de milho (Figura 6.14 A). Nos espectros dos resíduos correspondentes às amostras de farinha de sorgo cozida pode detectar-se a presença de sinais de Amida I e II, esta presença é indicadora da deficiente extractabilidade da proteína em amostras de sorgo cozida. Juntamente com as proteínas parece terem ficado no resíduo compostos fenólicos que absorvem a  $1730\text{ cm}^{-1}$  (Figura 6.14 B).



**Figura 6.14:** Espectros de FT-IR dos resíduos amiláceos depois da extracção com t-butanol 60% a partir de farinha crua (**A**) e a partir de farinha cozida (**B**).

### 6.3.2.2 Extracção com solução de Wallace

- extractos proteicos

Como foi referido anteriormente, a extracção com solução de Wallace ocorre em meio redutor. No entanto, após diálise e liofilização é provável que tenha ocorrido rearranjo das ligações S-S e que a amostra não apresente apenas monómeros mas também oligómeros.

Os espectros de FT-IR dos extractos proteicos mostram que a amostra é maioritariamente constituída por proteína; notam-se claramente os sinais da Amida I ( $1640\text{ cm}^{-1}$ ), da Amida II ( $1531\text{ cm}^{-1}$ ).

Dado a intensidade destes sinais proteicos pode afirmar-se que esta extracção é mais eficiente do que a extracção com t-butanol 60%. A localização dos referidos sinais é distinta do que no caso das prolaminas de farinha crua extraídas com t-butanol 60%.

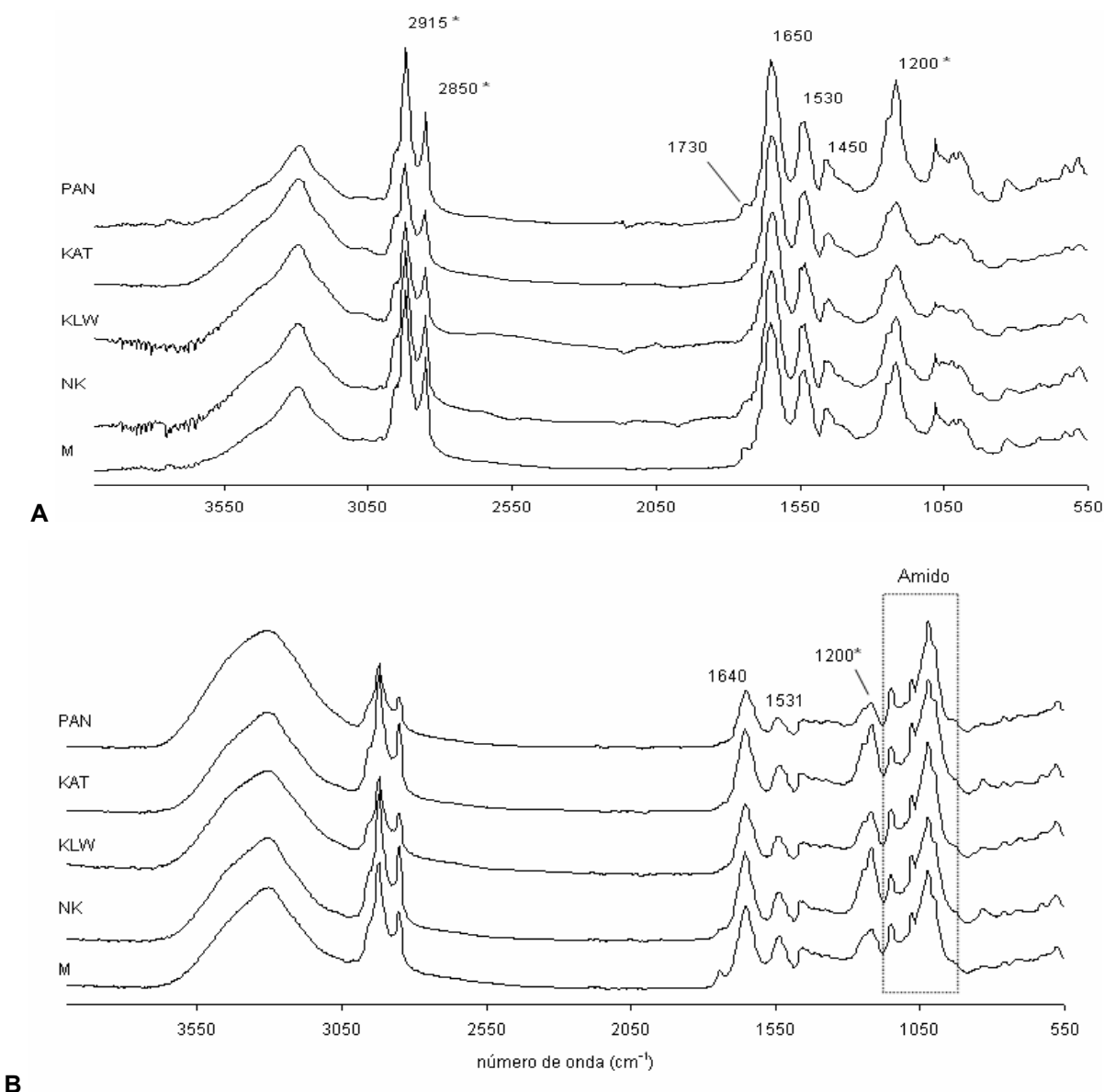
A presença de um sinal intenso a  $1200\text{ cm}^{-1}$ , em conjunto com sinais invulgarmente intensos a  $2915$  e  $2850\text{ cm}^{-1}$ , são indicadores de uma diálise ineficiente uma vez que estes sinais correspondem à presença de SDS na amostra. O SDS faz parte da composição da solução de extracção de Wallace.

Os compostos fenólicos parecem estar presentes nestes extractos, a sua presença é indicada por um sinal a  $1730\text{ cm}^{-1}$ . Nestes espectros a ausência do sinal a  $1704\text{ cm}^{-1}$  poderá indicar que, nos espectros apresentados na Figura 6.13, os compostos responsáveis pelo aparecimento deste sinal são compostos fenólicos e não ácidos gordos. Se fossem ácidos gordos seriam preferencialmente extraídos pela solução de Wallace (devido ao SDS) e isso não acontece (Figura 6.15 A).

No que diz respeito às amostras de prolaminas extraídas de farinha cozida, com uma rápida análise dos espectros nota-se à partida que a intensidade dos sinais correspondentes à proteína são bem mais intensos do que no caso da extracção com t-butanol 60%. Pode concluir-se, então, que esta extracção é mais eficiente que a extracção efectuada com álcool.

A presença de SDS não é tão acentuada como no caso das prolaminas cruas. Uma vez que os ensaios foram efectuados com duas alíquotas distintas, neste caso a diálise pode ter sido mais eficiente.

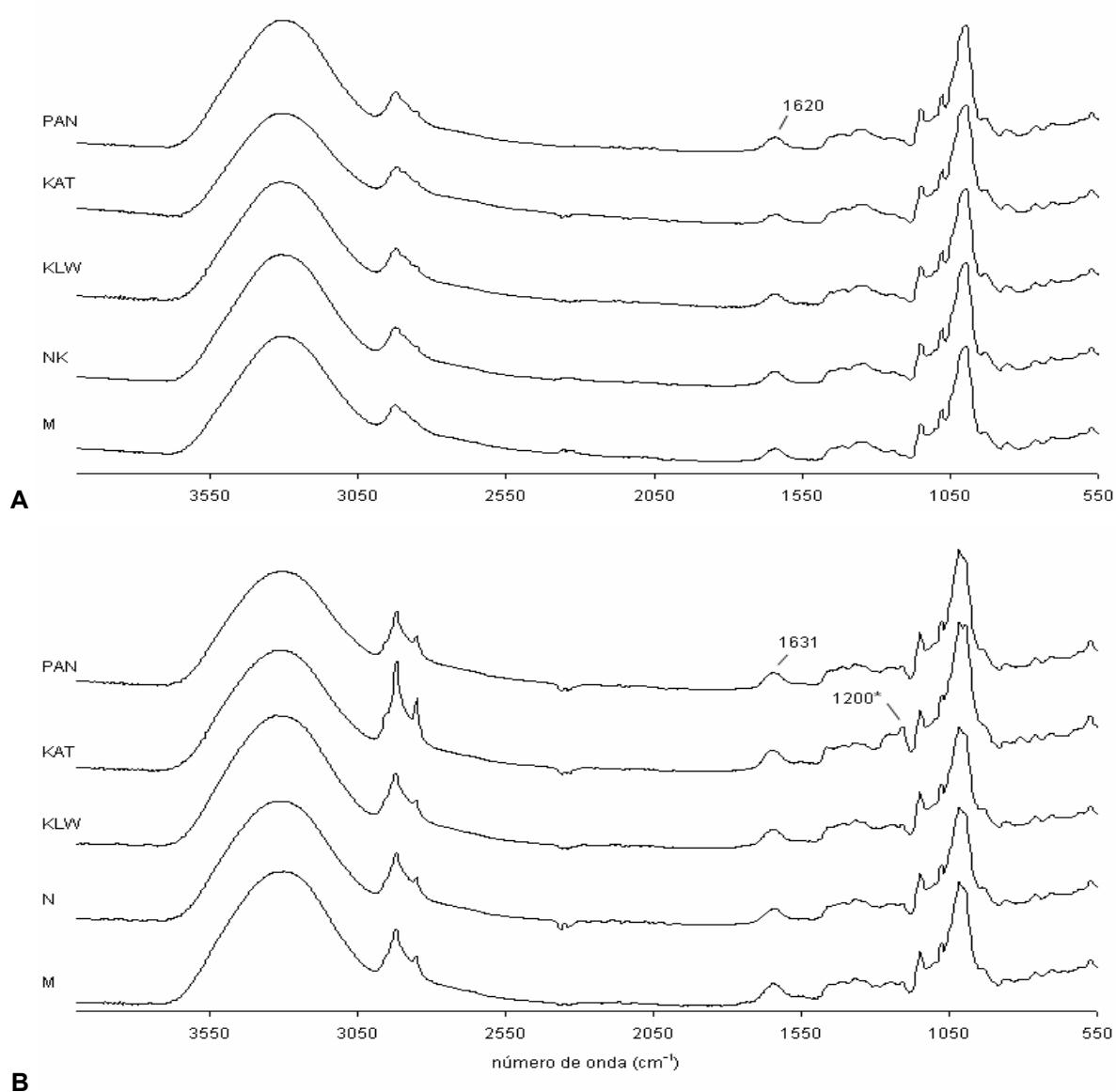
A presença de sinais correspondentes ao amido (região  $1000\text{ cm}^{-1}$ ) no espectro correspondente às prolaminas de farinha pode, mais uma vez, ser indicadora de algum tipo de complexação entre prolaminas-amido aquando do cozimento (Bach Knudsen *et al.* 1988) ou de extracção de alguma fracção de amido solubilizada pela gelatinização (Figura 6.15 B).



**Figura 6.15:** Espectros de FT-IR dos extractos de prolaminas obtidos por extracção com solução de Wallace a partir de farinha crua (**A**) e a partir de farinha cozida (**B**).

- resíduos amiláceos

Na Figura 6.16 são apresentados os espectros dos resíduos amiláceos que ficam após extracção com solução de Wallace tanto de amostras cruas (A) como cozidas (B).



**Figura 6.16:** Espectros de FT-IR dos resíduos resultantes após extracção com solução de Wallace a partir de farinha crua (A) e a partir de farinha cozida (B).

No que diz respeito à região correspondente às proteínas não se detectam diferenças entre os espectros; tanto nos resíduos crus como cozidos a proteína, se existir, é mínima.

As únicas diferenças a salientar entre estes grupos de espectros podem resumir-se à região do amido (região  $1000\text{ cm}^{-1}$ ) que, evidentemente, mostra estar gelatinizado nos espectros correspondentes às amostras cozidas (discussão mais detalhadas no Capítulo 13).

### 6.3.3 Estudo dos polímeros proteicos por SDS-PAGE preparativa

Uma vez que foi possível a análise dos extractos de prolaminas cruas e cozidas por SDS-PAGE em condições não redutoras foi possível, também, o estudo da composição de cada um dos oligómeros por electroforese preparativa.

Como foi descrito anteriormente de um gel de SDS-PAGE revelado com Coomassie são cortadas bandas de interesse e a proteína nelas contida é extraída, em meio redutor, e a solução de proteína assim obtida (monómeros e/ou oligómero não redutível) é aplicada num novo gel de forma a que se consiga estudar a sua composição.

Neste caso concreto foram analisadas as proteínas contidas nas bandas electroforéticas: entre 200 e 97 kDa (aglomerados de elevados peso molecular), 66 kDa e 45 kDa. De forma a confirmar a eficiência deste método para as proteínas em questão foram também analisadas as bandas electroforéticas correspondentes aos monómeros  $\gamma$ ,  $\alpha$  e  $\beta$ .

#### 6.3.3.1 Amostras cruas

Na Figura 6. 17 são apresentados os géis que nos permitiram analisar a composição dos oligómeros referentes aos extractos de prolaminas das farinhas de milho e de sorgo cruas. Na Tabela 6.3 é apresentado um resumo dos resultados visualizados nos electroforegramas da Figura 6.17.

De acordo com os resultados obtidos, os aglomerados de elevado peso molecular do milho são constituídos por monómeros  $\gamma + \alpha$ , enquanto que no sorgo os aglomerados são constituídos apenas pelo monómero  $\alpha$ . Estes resultados não estão de acordo com resultados previamente publicados por El Nour *et al.* em 1998. Naquele estudo detectaram quantidades vestigiais de monómero  $\beta$  na composição dos aglomerados de elevado peso molecular.

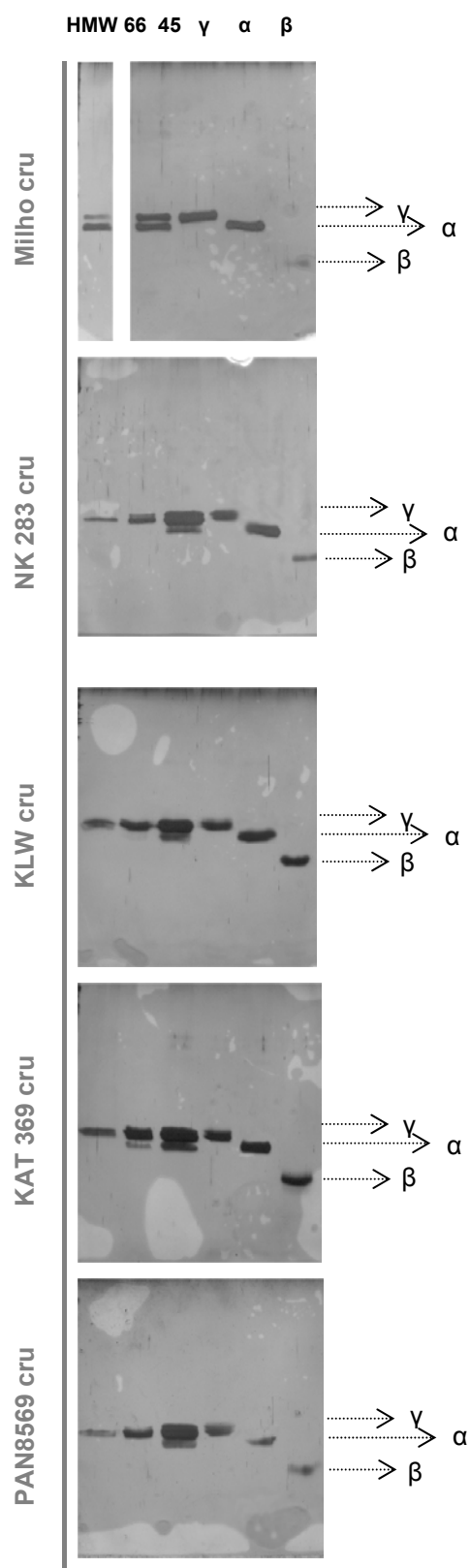
O oligómero a 66 kDa, presente apenas em amostras de sorgo, apresenta composição distinta de acordo com a variedade de sorgo em questão; nas variedades K LW e KAT369 é constituído pelos monómeros  $\gamma + \alpha$ , enquanto que nas variedades NK 283 e PAN8569 apresenta na sua composição o monómero  $\gamma$ .

No que diz respeito ao oligómero 45 kDa, a sua composição não depende da variedade: os monómeros  $\gamma + \alpha$  foram detectados em todos os casos estudados.

**Tabela 6.3:** Composição dos oligómeros dos extractos de prolaminas de amostras de farinha cruas.

		Polímero		
		HMW	66 kDa	45 kDa
Amostras cruas	Milho	$\gamma + \alpha$	-	$\gamma + \alpha$
	NK283	$\gamma$	$\gamma$	$\gamma + \alpha$
	K LW	$\gamma$	$\gamma + \alpha$	$\gamma + \alpha$
	KAT369	$\gamma$	$\gamma + \alpha$	$\gamma + \alpha$
	PAN8569	$\gamma$	$\gamma$	$\gamma + \alpha$

Como se pode verificar por observação da Figura 6. 17, o monómero  $\beta$  foi apenas detectado na sua forma livre. Esta informação foi confirmada pela análise quantitativa das fracção de prolaminas reduzidas e não reduzidas (Tabelas 6.1 e 6. 2). Nas referidas tabelas pode verificar-se que a quantidade de monómero  $\beta$  livre não aumenta com a redução, então ele não deve estar presente nem na composição dos aglomerados de elevados peso molecular nem dos oligómeros.



**Figura 6.17:** Composição das bandas electroforéticas das fracções de prolaminas extraídas de farinha crua analisadas por electroforese preparativa.



### 6.3.3.2 Amostras cozidas

Na Figura 6.18 estão apresentados os electroforegramas referentes à electroforese preparativa dos extractos de prolaminas das amostras de farinha cozidas.

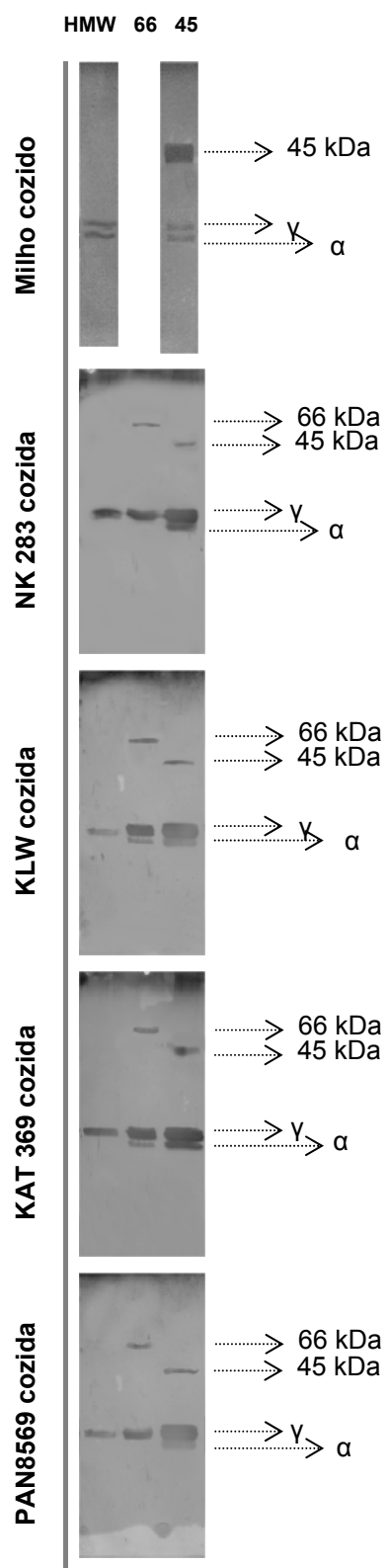
Contrariamente ao que ocorre com as amostras cruas, as bandas correspondentes ao monómero  $\beta$  não foram detectadas no segundo gel. Durante o decorrer deste trabalho, observou-se que o cozimento parece diminuir a quantidade de monómero  $\beta$ . Este é recuperado, do resíduo amiláceo, com solução extractante alcalina (solução de Wallace, por exemplo). Por sua vez, as bandas correspondentes aos monómeros  $\gamma$  e  $\alpha$  do milho não são apresentadas por serem demasiado concentradas.

De acordo com os resultados (também sumariados na Tabela 6.4), os aglomerados de elevados peso molecular apresentam a mesma composição que no caso das amostras de prolaminas cruas: nas zeínas são constituídos pelos monómeros  $\gamma + \alpha$  e nas kafirinas são constituídos pelo monómero  $\gamma$ .

**Tabela 6.4:** Composição dos oligómeros dos extractos de prolaminas de amostras de farinha cozidas.

		Polímero		
		HMW	66 kDa	45 kDa
Amostras	Milho	$\gamma + \alpha$	-	45kDa + $\gamma + \alpha$
	NK283	$\gamma$	66 kDa + $\gamma$	45kDa + $\gamma + \alpha$
	KLW	$\gamma$	66 kDa + $\gamma + \alpha$	45kDa + $\gamma + \alpha$
	KAT369	$\gamma$	66 kDa + $\gamma + \alpha$	45kDa + $\gamma + \alpha$
	PAN8569	$\gamma$	66 kDa + $\gamma$	45kDa + $\gamma + \alpha$

Parte do oligómero de 66 kDa, presente apenas nas amostras de sorgo, não é susceptível de redução. Uma outra parte reduz-se em  $\gamma$  no NK283 e no PAN8569 e em  $\gamma + \alpha$  no KLW e no KAT369. Como se pode verificar, o cozimento induz alterações da fracção de prolaminas das farinhas que dificultam o aceso do agente redutor às ligações S-S.



**Figura 6.18:** Composição das bandas electroforéticas das fracções de prolaminas extraídas de farinha cozida, analisadas por electroforese preparativa.

O oligómero de 45 kDa também sofre alterações com o cozimento. No caso das zeínas parte deste oligómero sofre redução, libertando os monómeros  $\gamma + \alpha$  e outra parte não é susceptível à presença de agente redutor. Nas kafirinas, o oligómero de 45 kDa comporta-se de forma similar às zeínas, uma parte reduz-se em monómero  $\gamma$  e outra parte não se reduz.

Todo este trabalho descrito, referente à caracterização dos oligómeros proteicos, foi repetido com concentrações de DTT superiores e com DTT e 2-mercaptoetanol. Os resultados foram sempre concordantes com os aqui apresentados.

## 6.4 Conclusões

No que diz respeito à caracterização de zeínas e kafirinas foram detectadas algumas diferenças consideradas significativas.

Em primeiro lugar, comprovou-se que a hidrofobicidade das zeínas é inferior à das kafirinas.

A fracção de prolaminas apresenta na sua composição aglomerados de elevado peso molecular, oligómeros e monómeros ( $\gamma$ ,  $\alpha$  e  $\beta$ ). Após análise qualitativa dos electroforegramas verificou-se que, os monómeros apresentam pesos moleculares distintos para o milho e para o sorgo. Em relação aos oligómeros, as kafirinas apresentam na sua composição um oligómero a 66 kDa que não foi detectado nas zeínas. Por sua vez, as zeínas apresentam, na sua composição, um oligómero de 42 kDa que parece não estar presente na composição das kafirinas.

Para as amostras cozidas, a extracção das proteínas com t-butanol 60% mostrou ser um processo pouco eficiente. A deficiente eficácia na extratibilidade deste solvente parece estar associada à difícil acessibilidade ao corpo proteico.

A composição dos oligómeros foi estabelecida, por electroforese preparativa, quer para as zeínas como para as kafirinas cruas e cozidas.

No que diz respeito ao oligómero de 66 kDa, as variedades cuja digestibilidade proteica é mais afectada com o cozimento (KLW e KAT369)

apresentam na composição os monómeros  $\gamma$  e  $\alpha$ . Nas restantes variedades esse oligómero é constituído, apenas, pelo monómero  $\gamma$ . Verificou-se, ainda, que, como cozimento, parte dos oligómeros tornaram-se resistentes à acção de agentes redutores.

O cozimento parece promover alterações nos oligómeros proteicos de sorgo que parecem estar relacionados com a diminuição da digestibilidade proteica com o cozimento. O de 66 kDa parece desempenhar um papel primordial em todo o processo, uma vez que este não está presente na amostra de milho e que aquando do cozimento sofre alterações significativas em todas as amostras de sorgo.

Estudos espectroscópicos revelaram a presença de amido nos extractos de prolaminas obtidas a partir de farinha cozida. Essa presença pode estar associada a possíveis interacções amido-proteína aquando do cozimento.

## 6.4 Bibliografia

- Ashton, F.M. (1976) Mobilization of storage proteins of seeds, *A. Rev. Pl. Physiol.*, **27**: 95-117.
- Bach Knudsen, K.E.; Kirleis, A.W.; Eggum, B.O. e Munck, L. (1988) Carbohydrate composition and nutritional quality for rats of sorghum tô prepared from decorticated white and whole grain red flour, *Journal of nutrition*, **118**: 588-597.
- Chibber, B.A.K.; Mertz, E.T. e Axtell, J.D. (1978) Effects of dehulling on tannin content, protein distribution and quality of high and low tannin sorghum, *J. Agric. Food Chem.*, **26**(3): 679-683.
- El Nour, I.N.A.; Peruffo, A.D.B. e Curioni, A. (1998) Characterization of sorghum kafirins in relation to their cross-linking behavior, *J. Cereal Sci.*, **28**: 197-207.
- Fliedel, G. e Kobrehel, K. (1985) Studies on sorghum proteins. 1. Solubilization of proteins with soaps, *J. Agric. Food Chem.*, **33**: 303-308.

- Guiragossian, V.; Chibber, B.A.K.; Van Scoyoc, S.; Jambunathan, R.; Mertz, E.T. e Axtell, J.D. (1978) Characteristics of protein from normal, high-lysine, and high tannin sorghums, *J. Agric. Food Chem.*, **26**: 219-223.
- Hamaker, B.R.; Kirleis, A.W.; Mertz, E.T. e Axtell, J.D. (1986) Effect of cooking on protein profiles and in vitro digestibility of sorghum and maize, *J. Agric. Food Chem.*, **34**: 647-649.
- Hamaker, B.R.; Mohamed, A.A.; Habben, J.E.; Huang, C.P. e Larkins, B.A. (1995) Efficient procedure for extracting maize and sorghum kernel proteins reveals higher prolamin content than conventional methods, *Cereal Chem.*, **72**(6): 583-588.
- Jambunathan, R. e Mertz, E.T. (1973) Relationship between tannin levels, rat growth, and distribution of proteins in sorghum, *J. Agric. Food Chem.*, **21**: 692-696.
- Jambunathan, R.; Mertz, E.T. e Axtell, J.D. (1975) Fractionation of soluble proteins of high-lysine and normal sorghum grain, *Cereal Chem.*, **52**: 119-121.
- Krishnan, H.B.; White, J.A. e Pueppke, S.G. (1989) Immunocytochemical analysis of protein body formation in seeds of Sorghum bicolor, *Can. J. Bot.*, **67**: 2850-2856.
- Landry, J. e Moureaux, T. (1970) Heterogeneite des glutelines du grain de mais: extraction selective et composition en acides aminés des trois fractions isolles, *Bull. Chim. Biol.*, **52**: 1021-1037.
- Mazhar, H. e Chandrashekar, A. (1993) Differences in kafirin composition during endosperm development and germination in sorghum cultivars of varying hardness, *Cereal Chem.*, **70**: 667-671.
- Moreno, M. R.; Smith, J. F. e Smith, R. V. (1995) Silver staining of proteins in polyacrylamide gels: increased sensitivity thought a combined coomassie blue – silver staining procedure, *Anal. Biochem.*, **151**, 466-470.
- Oria, M.P.; Hamaker, B.R.; Axtell, J.D. e Huang, C.-P. (2000) A highly digestible sorghum mutant cultivar exhibits a unique folded structure of endosperm protein bodies, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **97**(10): 5065-5070.
- Paulis, J.W. e Wall, J.S. (1979) Distribution and electrophoretic properties of alcohol-soluble proteins in normal and high-lysine sorghums, *Cereal Chem.*, **56**(1): 20-23.

- Sastry, L.V.S.; Paulis, J.W.; Bietz, J.A. e Wall; J.S. (1986) Genetic variation of storage protein in sorghum grain: studies by isoelectric focusing and high performance liquid chromatography, *Cereal Chem.*, **63**: 420-427.
- Sekinger, H.L. e Wolf, M.J. (1973) Sorghum protein ultrastructure as it relates composition, *Cereal Chem.*, **50**: 455-465.
- Shewry, P.R.; Tathan, A.S. e Fido, R.J. (1995) Separation of plant Proteins by Electrophoresis in Plant Gene Transfer and Expression Protocols (H. Jones Ed.) Humana Press: Totowa, New Jersey.
- Shull, J.M.; Watterson, J.J. e Kirleis, A.W. (1991) Proposed nomenclature for alcohol-soluble proteins (kafirins) of Sorghum bicolor (L.) Moench based on molecular weight, solubility and structure, *J. Agric. Food Chem.*, **39**: 83-87.
- Shull, J.M.; Watterson, J.J. e Kirleis, A.W. (1992) Purification and immunocytochemical localization of kafirins in Sorghum bicolor (L.) Moench endosperm, *Protoplasma*, **171**: 64-74.
- Skotch, L.W.; Deyoe, C.W.; Shoup, F.K.; Bathurst, J. e Liang, D. (1970) Protein fractionation of sorghum grain, *Cereal Chem.*, **47**: 472-481.
- Spencer, C.M.; Cai, Y.; Martin, R.; Gaffney, S.H.; Goulding, P.N.; Magnolato, D.; Lilley, T.H. e Haslam, E. (1988) Polyphenol complexation - some thoughts and observations, *Phytochemistry*, **27**(8): 2387-2409.
- Taylor, J.R.N.; Schussler, L. e van der Walt, W.H. (1984a) Fractionation of proteins from low-tannin sorghum grain, *J. Agric. Food Chem.*, **32**: 149-154.
- Taylor, J.R.N.; Novellie, L. e Liebenberg, N.v.d.W. (1984b) Sorghum protein body composition and ultrastructure, *Cereal Chem.*, **61**(1): 69-73.
- Taylor, J.R.N.; Schussler, L. e Liebenberg, N.W. (1984c) Location of zein-2 and cross linked kafirin in maize and sorghum protein bodies, *J. Cereal Sci.*, **2**: 249-255.
- Taylor, J.R.N.; Schussler, L. e Liebenberg, N.v.d.W. (1985) Protein body formation in the starchy endosperm of developing Sorghum bicolor (L.) Moench seeds, *S.-Afr. Tydskr. Plantk.*, **51**(1): 81-86.

- Wall, J.S. e Paulis, J.W. (1978) Corn and soeghum grain proteins, *Adv. Cereal Sci. Technol.*, **2**: 135-219.
- Wallace, J.C.; Lopes, M.A.; Paiva, E. e Larkins, B.A. (1990) New methods for extraction and quantitation of zeins reveals a high content of gama-zein in modified opaque-2, *Plant Physiol*, **92**: 191-196.
- Watterson, J.J.; Shull, J.M. e Kirleis, A.W. (1993) Quantitation of alfa-, beta- and gamma-kafirins in vitreous and opaque endosperm of Sorghum bicolor, *Cereal Chem.*, **70**(4): 452-457.





# Digestibilidade proteica *in vitro*

## 7.1 Introdução

As proteínas do sorgo são as únicas, entre as proteínas de plantas comestíveis, cuja digestibilidade diminui acentuadamente com o cozimento (Axtell *et al.* 1981; Eggum *et al.* 1983; Mitaru *et al.* 1985 e Oria *et al.* 1995).

A digestibilidade é uma característica importante para a qualidade alimentar de um cereal. Principalmente quando esse cereal contribui para a subsistência de aproximadamente 700 milhões de pessoas e nas zonas onde é consumido, a população apresenta um elevado grau de subnutrição (Hulse *et al.* 1980).

Foram desenvolvidos vários estudos *in vivo* na tentativa de estudar a digestibilidade aparente das proteínas sorgo. Os referidos estudos comprovaram que as proteínas de sorgo são menos digeríveis que as dos restantes cereais.

Kurien *et al.* (1960) desenvolveram estudos com rapazes (10 a 11 anos) e concluíram que, quando alimentados com arroz, o valores da digestibilidade aparente das proteínas era de 75%, enquanto que quando alimentados com sorgo, os valores decresciam para 55%.

Uma vez que os taninos têm sido apontados como a causa da deficiente digestibilidade do sorgo Armstrong *et al.* (1974) e Chibber *et al.* (1980), repetiram este tipo de ensaios com variedades de sorgo pobres em taninos. Os resultados encontrados foram similares.

Mais tarde, em 1981, MacLean *et al.* publicaram resultados de estudos efectuados em crianças peruanas (6 a 27 meses). Nesse estudo baseado em balanços de azoto, concluiu-se que a digestibilidade do sorgo cozido (46%) é

significativamente menor que a do trigo (81%), milho (73%) e arroz cozidos (66%).

Paralelamente, foram efectuados estudos *in vivo* com animais. Estes estudos confirmaram que o cozimento promove a redução da digestibilidade das proteínas do sorgo. Utilizando ratos, verificou-se que nas proteínas do sorgo cozido a digestibilidade era 7% menor que nas proteínas do sorgo cru (Eggum *et al.* 1983). Em ensaios com galinhas, a diminuição da digestibilidade das proteínas do sorgo cozido comparativamente às de sorgo cru era de 31,5% (Mitaru *et al.* 1985).

Devido às restrições éticas associadas ao desenvolvimento de ensaios *in vivo*, posteriormente recorreu-se a ensaios *in vitro* utilizando enzimas, para confirmar os resultados de digestibilidade *in vivo*.

Embora os sistemas *in vitro* não se possam comparar com os sistemas *in vivo* no que diz respeito à complexidade fisiológica, podem servir de modelos para examinar as características dos alimentos, nomeadamente as que interferem na digestibilidade proteica.

Os primeiros estudos *in vitro* com farinha de sorgo foram desenvolvidos por Chibber *et al.* (1980).

Axtell *et al.* (1981) também trabalharam na mesma área e obtiveram resultados similares aos encontrados em sistemas *in vivo* com pepsina de porco. Esses autores verificaram que os valores de digestibilidade diminuíam de 78-100% para 45-55% com o cozimento. Estes resultados indicam que esta forma de processamento do sorgo altera as suas proteínas tornando-as menos digeríveis.

Hamaker *et al.* (1986), também efectuaram ensaios *in vitro* e concluíram que com pepsina e/ou tripsina/quimotripsina a digestibilidade do sorgo diminui, pelo menos, 15% com o cozimento enquanto que a do milho se mantém. Verificaram também que as proteínas de sorgo cozido tornam-se menos extractáveis quando comparadas com proteínas de milho cozido. Estes resultados foram confirmados por Agudelo *et al.* (1998).

O mesmo estudo de Hamaker *et al.* (1986) demonstrou, por SDS-PAGE, que as kafirinas são a fracção proteica responsável pela diminuição da digestibilidade das proteínas.

Investigações recentes conduziram ao fabrico de um estômago e de um intestino modelo. Estes sistemas *in vitro* permitem simular, monitorizar e analisar todo o processo de digestão e desta forma compreende-lo melhor (Venema *et al.* 2003).

## 7.2 Metodologia

- 1º Preparação das amostras de farinha crua e cozida.
- 2º Ensaio da digestibilidade *in vitro*.
- 3º Cálculo do teor proteico antes (0 minutos) e depois (120 minutos) da digestão com pepsina.
- 4º Cálculo da digestibilidade proteica da farinha crua e cozida.
- 5º Estudos dos resíduos digeridos por FT-IR.

### 7.2.1 Preparação das amostras

Os grãos de cereal (Milho, NK283, KWL, KAT369 e PAN8564) foram fornecidos pela Universidade da Pretória (África do Sul). Após terem sido moídos num moinho de café, foram peneirados num peneiro mecânico para obtenção de uma farinha com granulometria  $\leq 400 \mu\text{m}$ .

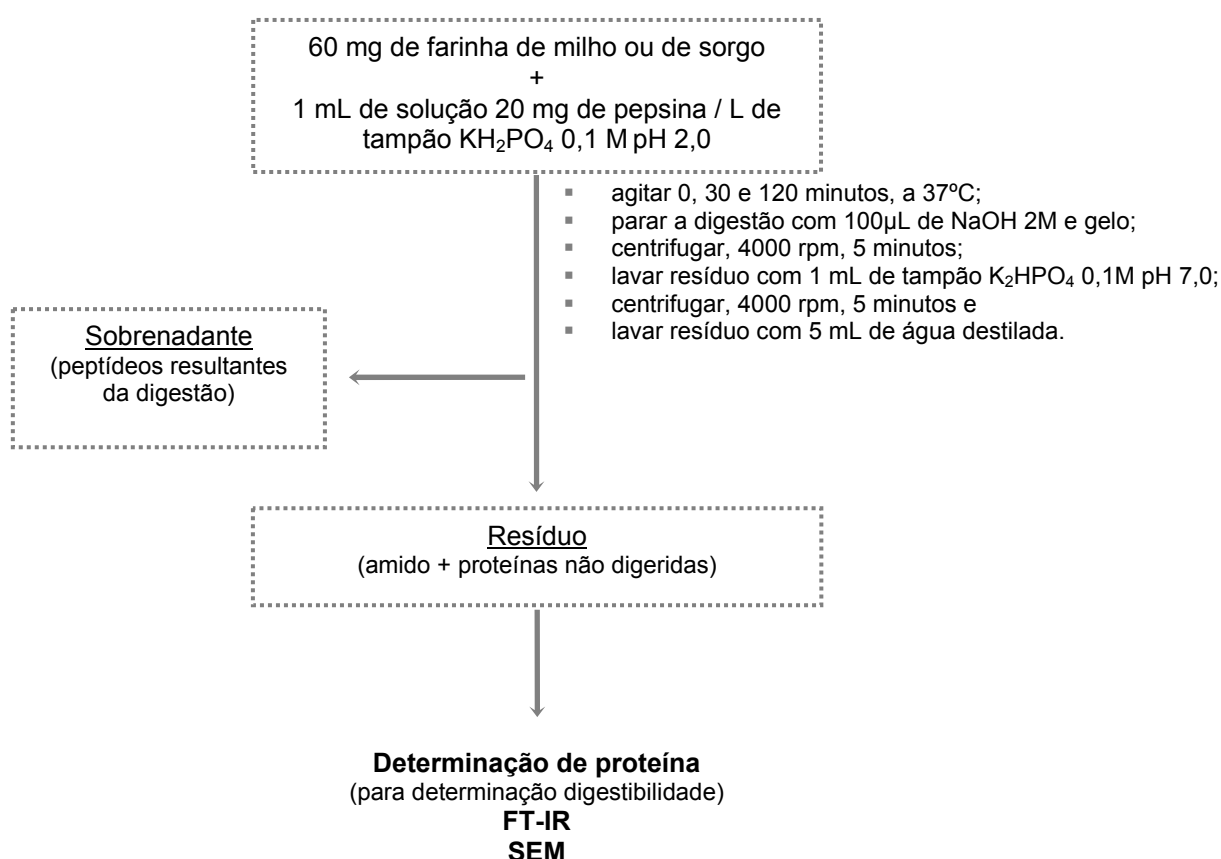
Para a obtenção de farinha cozida, as amostras de farinha foram misturadas com água na proporção de 1:10 e colocadas em banho fervente durante 20 minutos. Após o arrefecimento das amostras à temperatura ambiente estas foram congeladas e em seguida liofilizadas de forma a não haver perdas de massa.

### 7.2.2 Ensaio de digestibilidade

A determinação da digestibilidade das amostras de farinha de sorgo e milho cruas e cozidas foi efectuada através de um ensaio *in vitro* modificado

a partir dos ensaios desenvolvidos por Weaver *et al.* (1998) e Aboubacar *et al.* (2001) (Figura 7.1).

A enzima utilizada para a digestão foi a pepsina A do estômago de porco, protease acídica de 35 kDa, com pH ótimo de 1 e instável acima de pH 6. Cliva as proteínas nos grupos carboxílicos de aminoácidos aromáticos, como é o caso da fenilalanina e tirosina. Não cliva ligações peptídicas com valina, alanina e glicina.



**Figura 7.1:** Fluxograma referente ao procedimento da determinação da digestão proteica *in vitro*.

A 60 mg farinha foi adicionado 1 mL de solução de pepsina (Sigma P-7000, actividade 975 U/mg de proteína, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) em tampão  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1 M a pH 2,0 (20 mg de pepsina / mL). As misturas foram mantidas sob agitação magnética por 2 horas a 37 °C. Ao fim deste período de tempo, a digestão com pepsina foi interrompida por adição de 100 µL de NaOH 2 M e por diminuição da temperatura em banho de gelo. Após centrifugação (centrífuga Kubota 2010) a 4000 rpm por 5 minutos os

sobrenadantes, contendo os peptídeos resultantes da digestão das proteínas por pepsina, foram descartados. Os resíduos, contendo o amido e as proteínas não digeridas, foram lavados com 1 mL de tampão  $K_2HPO_4$  0,1 M a pH 7,0.

Após nova centrifugação, nas mesmas condições, os sobrenadantes foram rejeitados.

Os resíduos resultantes são constituídos maioritariamente pelo amido e pelas prolaminas não digeridas pela pepsina (Figura 7.1).

### 7.2.3 Determinação de proteína para cálculo da digestibilidade

Após a digestão com pepsina, os resíduos das amostras após 0 ( $t_0$ ) e 120 ( $t_{120}$ ) minutos de digestão com pepsina foram liofilizados e submetidos a determinação do azoto total por análise elementar.

Para o ensaio em branco ( $t_0$ ) adicionou-se, simultaneamente, pepsina e NaOH, não chegando, portanto, a haver digestão.

Para a conversão do azoto total em proteína bruta não digerida, utilizou-se o factor convencional para cereais de 6,25 (Norma Portuguesa nº 1996).

### 7.2.4 Cálculo dos valores de digestibilidade

A percentagem de digestibilidade foi então calculada através da fórmula:

$$\frac{[N_0] - [N_{120}]}{[N_0]} \times 100$$

em que  $N_0$  é o teor de azoto na amostra sem digestão e  $N_{120}$  o teor em azoto da amostra com 120 minutos de digestão com pepsina.

### 7.2.5 Ensaio de FT-IR

Os resíduos não digeridos foram analisados por FT-IR. Os espectros foram adquiridos na gama de 4000 a 500  $cm^{-1}$  com resolução de 8  $cm^{-1}$  (na

gama de infravermelho médio) num espectrómetro Bruker IFS 55 com acessório Golden Gate (sistema de ATR de reflexão única), com acumulação de 256 scans. Foram realizadas cinco réplicas de cada amostra.

Os espectros de FT-IR foram submetidos a uma análise exploratória – análise em componentes principais (PCA), utilizando um programa desenvolvido por Barros (1999).

As amostras foram também submetidas a microscopia electrónica de varrimento (SEM).

## 7.3 Resultados e discussão

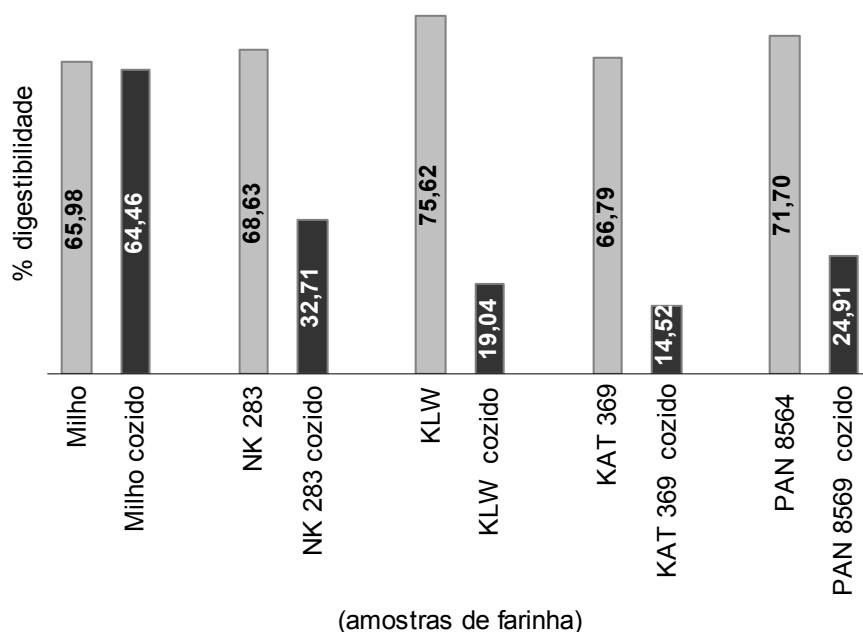
### 7.3.1 Digestibilidade proteica de farinha crua e cozida

Podemos começar por definir digestibilidade proteica como “a quantidade de proteína digerida pela pepsina (20 mg pepsina /mL 0,1 M tampão  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH2) a 37°C durante 2 horas”.

No que diz respeito aos valores de digestibilidade de amostras de milho e sorgo cru, pode verificar-se que apresentam valores de digestibilidade proteica bastante similares. Foram encontrados valores de digestibilidade proteica de 65,98%, 68,63%, 75,62%, 66,79%, 71,70%, respectivamente para Milho, NK 283, K LW, KAT 369 e PAN 8569.

A variedade de sorgo K LW crua é a variedade de que apresenta valores superiores de digestibilidade. Quando cruas, quase todas as variedades de sorgo apresentam digestibilidade proteica superior à do milho (Figura 7.2).

O processo de cozimento altera drasticamente os valores de digestibilidade proteica do sorgo. Como seria de esperar, enquanto que os valores de digestibilidade proteica do milho não parecem ser alterados com o cozimento (65,98% - amostra crua e 64,46% - amostra cozida), nas variedades de sorgo a diminuição da digestibilidade proteica é drástica. Os valores de digestibilidade proteica, quando se trata de amostras de sorgo cozido, passam a ser de 32,71% para a variedade NK 283; 19,04% para a K LW; 14,52% para a KAT 369 e de 24,91% para a PAN 8569 (Figura 7.2).



**Figura 7.2:** Percentagem da digestibilidade de amostras de farinha de milho e sorgo cruas e cozidas. Valores determinados a partir do teor em azoto em amostras digeridas e em amostras não digeridas.

O cozimento induz reduções dos valores de digestibilidade proteica de 52,34%, 74,82%, 78,26% e 65,26% para as variedades de sorgo NK 283, K LW, KAT 369 e PAN 8569, respectivamente (Tabela 7.1).

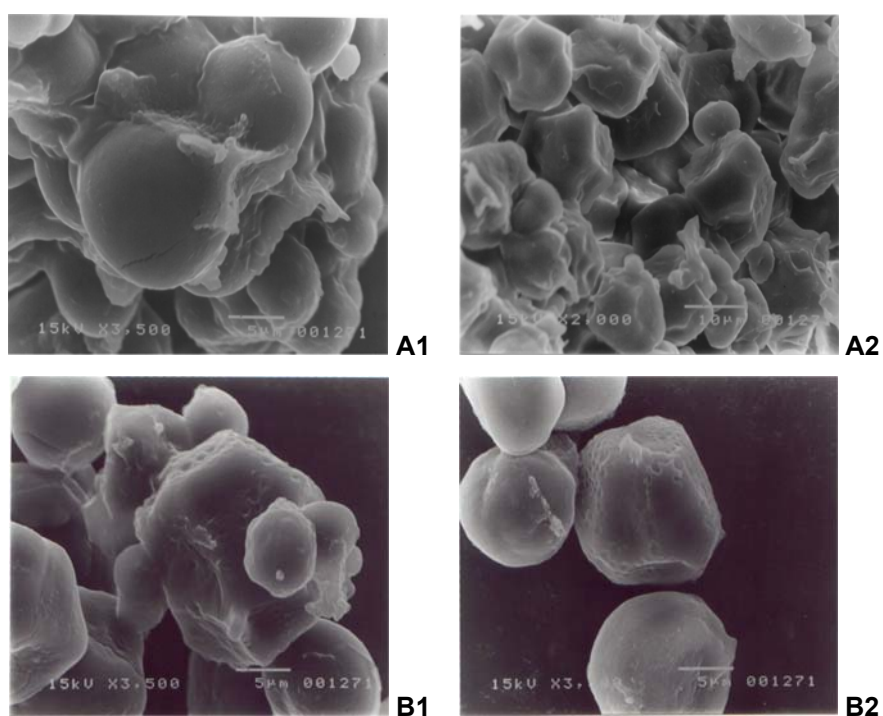
**Tabela 7.1:** Percentagem da digestibilidade de amostras de farinha de milho e sorgo cruas e cozidas. Redução dos valores de digestibilidade com o cozimento.

	Digestibilidade (amostras cruas)	Digestibilidade (amostras cozidas)	Redução da digestibilidade com o cozimento
Milho	65,98%	64,46%	1,52%
NK 283	68,63%	32,71%	52,34%
K LW	75,62%	19,04%	74,82%
KAT 369	66,79%	14,52%	78,26%
PAN 8569	71,70%	24,91%	65,26%

Curiosamente, sendo a variedade K LW a mais digerível quando crua é a mais afectada pelo cozimento. Em seguida, vem a variedade KAT 369. A variedade de sorgo NK 283 revelou ser a variedade de sorgo menos afectada pelo cozimento (Tabela 7.1).

### 7.3.2 Visualização dos resíduos digeridos por SEM

De forma a visualizar o que ocorre aquando da digestão, na Figura 7.3 são apresentadas imagens dos resíduos referentes à digestão da farinha de milho crua e de sorgo (K LW) crua após 0 e 120 minutos de digestão.



**Figura 7.3:** Micrografias referentes aos resíduos resultantes da digestão da farinha de milho crua após 0 (**A1** e **A2**) e 120 (**B1** e **B2**) minutos de digestão.

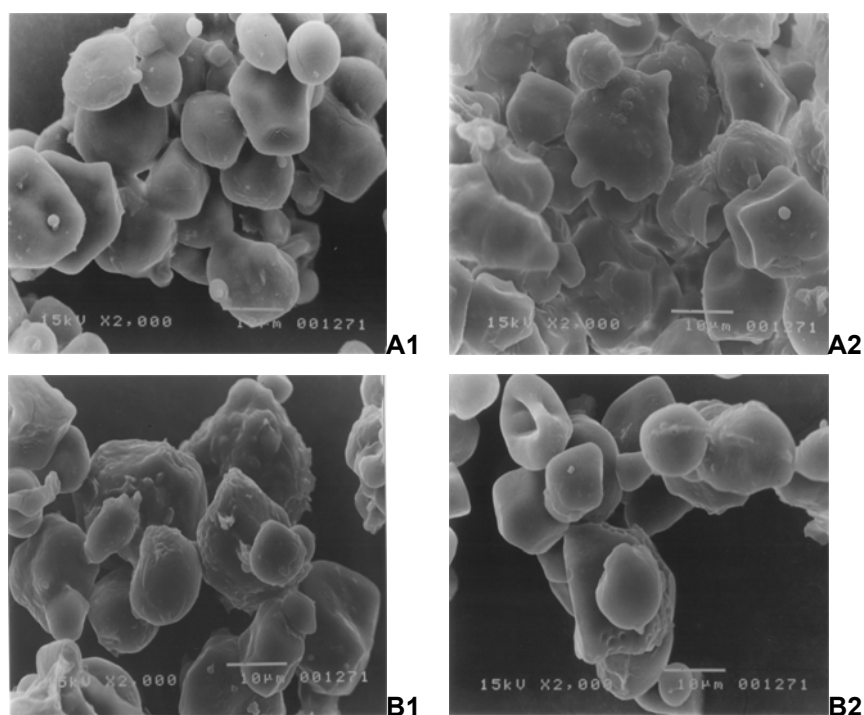
A Figura 7.3 A (1 e 2) é referente às amostras de farinha sem digestão. Pode visualizar-se os grânulos de amido rodeados por uma matriz proteica. Por detrás dessa matriz podem ainda notar-se alguns corpos proteicos.

Na Figura 7.3 B (1 e 2) vê-se uma amostra bastante menos complexa. Após 120 minutos de digestão com pepsina pode verificar-se a ausência da



matriz proteica e os grânulos de amido mais livres. Desta forma é também possível a visualização da sua superfície dos grânulos de amido.

O tratamento enzimático promoveu ainda a digestão dos corpos proteicos. A ausência desses organelos pode ser confirmada pela superfície irregular dos grânulos de amido, no qual se observam as concavidades onde estavam alojados os corpos proteicos. Essa superfície irregular ocasionada pela ausência dos corpos proteicos tinha sido já observada em estudos anteriores (Rom *et al.* 1992; Parker *et al.* 1999 e Duodu *et al.* 2002).



**Figura 7.4:** Micrografias referentes aos resíduos resultantes da digestão da farinha de sorgo (KLW) crua após 0 (**A1** e **A2**) e 120 (**B1** e **B2**) minutos de digestão.

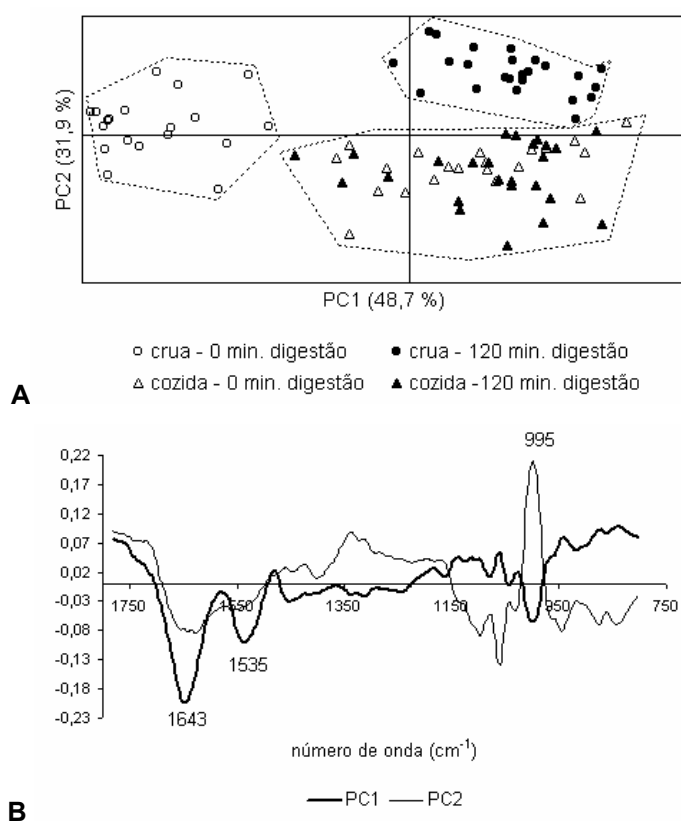
No que diz respeito à micrografias referentes ao sorgo da variedade KWL cru, apresentadas na Figura 7.4, elas fornecem informação similar às do milho. Esta semelhança sugere que o comportamento dos dois cereais quando crus é semelhante.

### 7.3.3 Análise dos resíduos digeridos por FT-IR

Procedeu-se à análise, em conjunto, dos resíduos crus e cozidos resultantes da digestão com pepsina durante 0 (t<sub>0</sub>) e 120 minutos (t<sub>120</sub>) de todas as amostras de sorgo e de milho. Pelo diagrama de coordenadas factoriais, pode verificar-se que as amostras foram discriminadas em três grupos. As amostras cruas com 0 minutos de digestão ficaram localizadas no PC1 (-), as amostras cruas com 120 minutos de digestão ficaram localizadas no 1º quadrante e amostras cozidas com 0 e 120 minutos de digestão ficaram juntas nos 3º e 4º quadrantes.

Nas amostras cozidas não se verifica discriminação entre tempos de digestão. Neste tipo de amostras o amido encontra-se gelatinizado e torna as amostras extremamente amorfas dificultando a reprodutibilidade.

Neste diagrama o PC1 é responsável por 48,7% da informação enquanto que o eixo PC2 é responsável por 31,9% (Figura 7.5 A).



**Figura 7.5: (A)** Diagrama de coordenadas factoriais de PC1 vs PC2 e **(B)** diagrama das contribuições factoriais do PC1 e PC2 referentes aos resíduos crus e cozidos não digeridos (t<sub>0</sub>) e digeridos durante 120 minutos (t<sub>120</sub>).

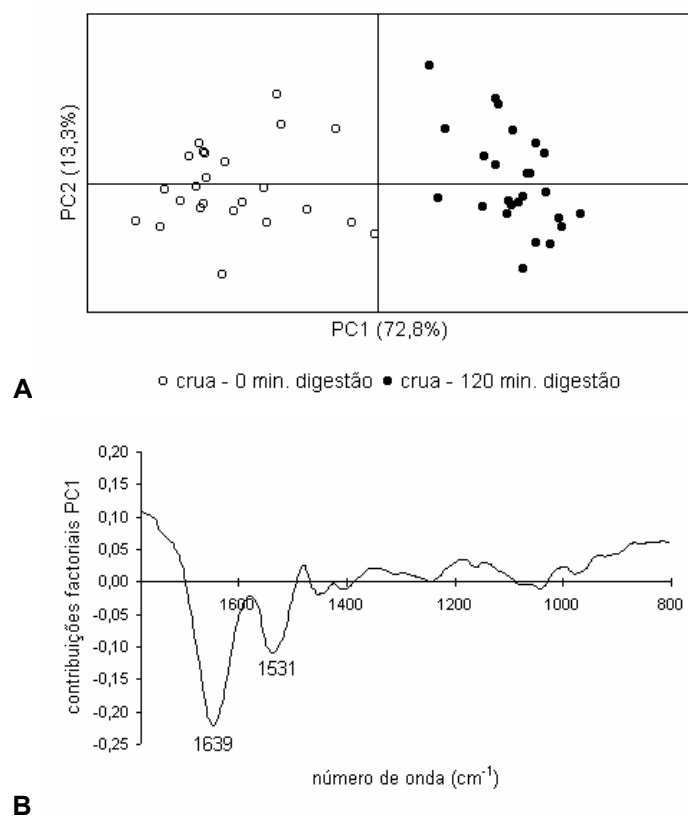
Com auxílio do diagramas das contribuições factoriais pode atribuir-se a discriminação dos resíduos crus com 0 minutos de digestão à presença de mais proteína.

Este grupo de amostras está localizado no eixo PC1 (-) e portanto correlacionadas com os sinais referentes à proteína (1643 e 1535  $\text{cm}^{-1}$ ). Estas amostras como não sofreram digestão, apresentam, portanto, teores mais elevados de proteína. As amostras cruas submetidas a 120 minutos de digestão apresentam comportamento antagónico; estão localizadas no 1º quadrante, estando portanto correlacionadas negativamente com o teor de proteína. As amostras cruas com 0 minutos de digestão são também caracterizadas por um sinal a 995  $\text{cm}^{-1}$ . Este sinal está relacionado com a cristalinidade do amido não gelatinizado.

No que diz respeito às amostras cozidas, tanto com 0 como com 120 minutos de digestão, estas estão localizadas na região PC2 (-). De acordo com o diagrama das contribuições factoriais a maior diferença entre estas amostras deve-se ao amido, o que não é de estranhar, pois, as amostras sofreram gelatinização.

A presença de sinais a 1643 e 1535  $\text{cm}^{-1}$  no perfil do PC1 correlacionados positivamente com estas amostras poderia levar a concluir que estas amostras apresentariam um teor proteico superior. Esta ilusão é causada pela presença do amido gelatinizado. Com a gelatinização o amido expende, ocupa mais volume, para a mesma massa de farinha, que as proteínas, camuflando-as (Figura 7.5 B).

Analisando as amostras cruas isoladamente obteve-se o diagramas das coordenadas factoriais apresentado na Figura 7.6 A. Desta vez o eixo PC1 é responsável por 72,8% da informação enquanto que o eixo PC2 explica 13,3% da informação. No referido diagrama observam-se dois grupos de amostras distintos e bem definidos. As amostras cruas com 0 minutos de digestão ficam localizadas no eixo PC1 (-) enquanto que as digeridas durante 120 minutos ficam localizadas na zona positiva do eixo PC1(+). Não há discriminação segundo o eixo PC2 (Figura 7.6 A).

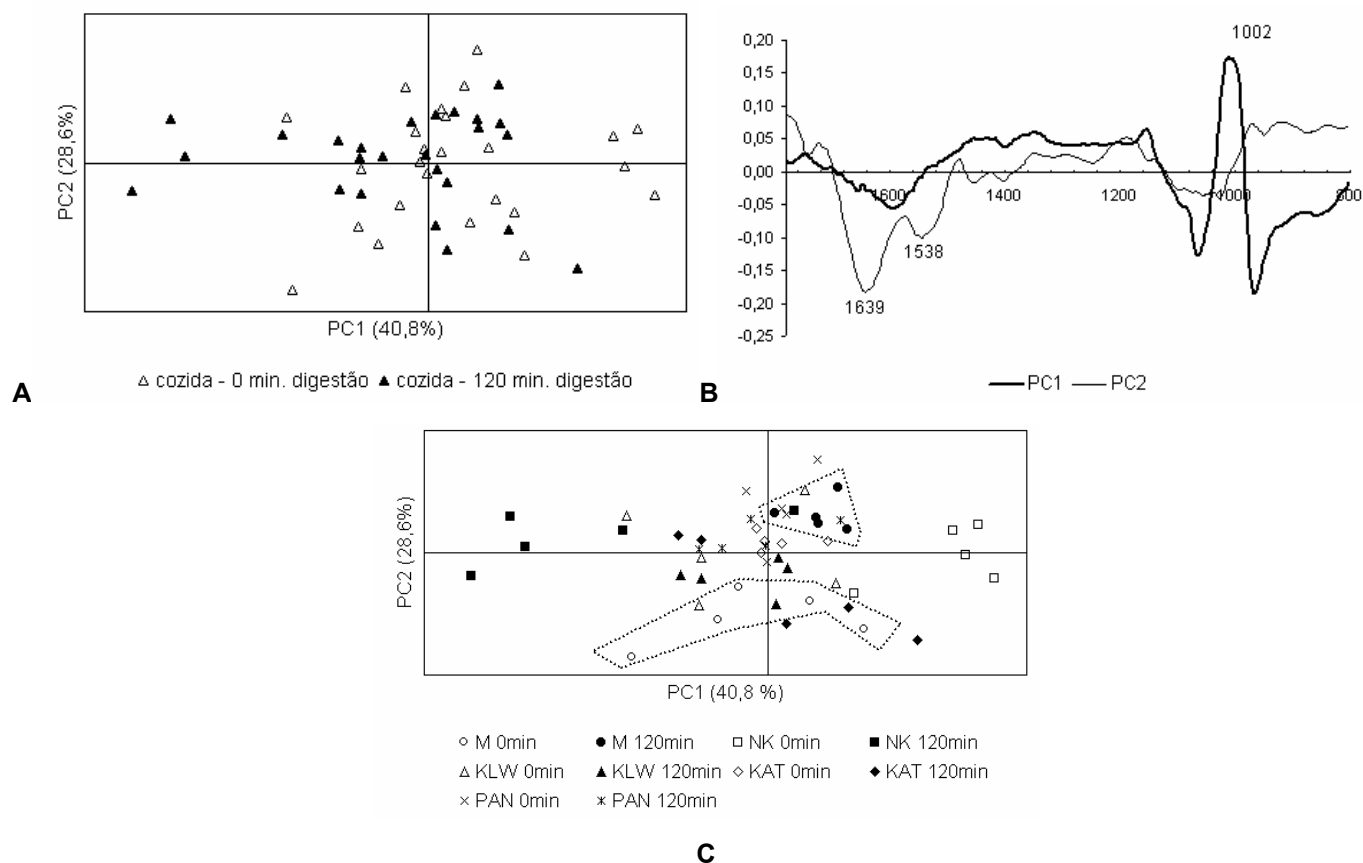


**Figura 7.6: (A)** Diagrama de coordenadas factoriais de PC1 vs PC2 e **(B)** diagrama das contribuições fatoriais do PC1 referentes aos resíduos crus não digeridos (t0) e digeridos durante 120 minutos (t120).

O diagrama das contribuições fatoriais permite confirmar que as amostras são discriminadas em função do teor em proteína. As amostras com 0 minutos de digestão, localizadas na região PC1 (-) estão correlacionadas com sinais espectroscópicos correspondentes a proteína apresentando, portanto, mais proteína que as amostras submetidas a 120 minutos de digestão. Estes resultados confirmam que a proteína das farinhas de sorgo e de milho vão sendo digeridas pela pepsina durante os 120 minutos de digestão.

Analisando, também, as amostras cozidas isoladamente obteve-se um outro diagrama de coordenadas factoriais apresentado na Figura 7.7 A. Nesta análise, e contrariamente ao que ocorreu com as amostras cruas, não se verificou discriminação entre as amostras com 0 e 120 minutos de digestão

(Figura 7.7 A). Investigou-se, ainda, a influência de diversidade varietal das amostras na deficiente discriminação do sistema, procedeu-se então à identificação diferenciada de cada uma das variedades de sorgo e de milho (Figura 7.7 C).



**Figura 7.7: (A)** Diagrama de coordenadas factoriais de PC1 vs PC2 e **(B)** diagrama das contribuições factoriais do PC1 e PC2 referentes aos resíduos cozidos não digeridos (t0) e digeridos durante 120 minutos (t120). **(C)** Diagrama de coordenadas factoriais de PC1 vs PC2 apresentando as cinco variedades de farinha diferenciadas.

Da identificação diferenciada das amostras verificou-se que a única amostra em que ocorreu discriminação em função da quantidade da proteína foi o milho. O milho cozido com 0 minutos de digestão encontra-se na região negativa do PC2 enquanto que a amostra com 120 minutos de digestão encontra-se na região positiva do referido eixo (Figura 7.7 C). Pela análise do diagrama das contribuições factoriais verifica-se que o perfil do PC2 apresenta sinais negativos correspondentes à proteína ( $1635$  e  $1538\text{ cm}^{-1}$ ), e

portanto, relacionadas com a amostra de milho com 0 minutos de digestão (Figura 7.7 B). As amostras de milho cozido digeridas são as que apresentam menor teor proteico após 120 minutos de digestão(t120), confirmando-se a sua melhor digestibilidade.

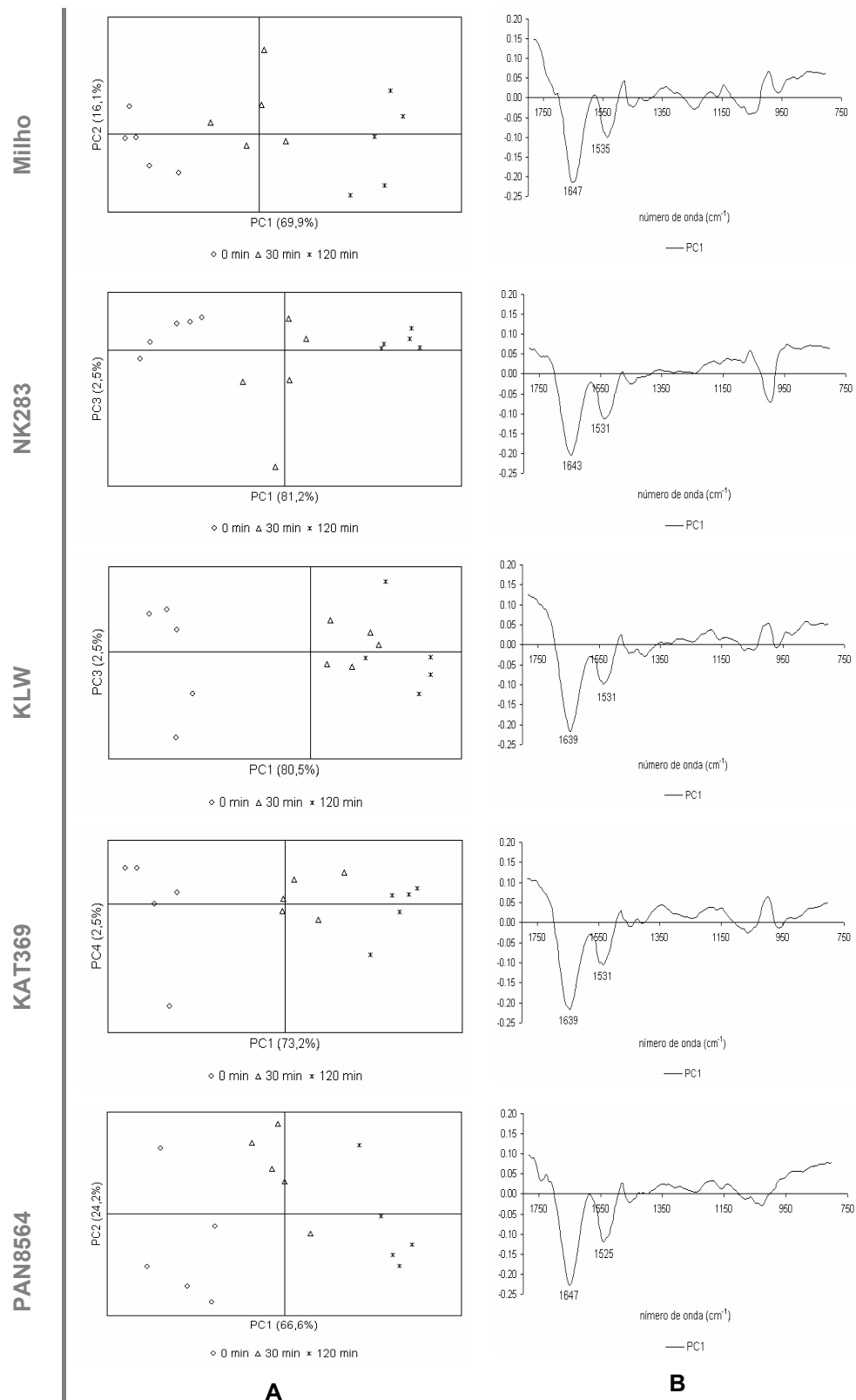
Como foi referido anteriormente a falta de discriminação das amostras cozidas pode dever-se ao carácter amorfo do amido gelatinizado e consequente perda de homogeneidade das amostras. A reduzida digestibilidade proteica das amostras de sorgo cozidas contribui, também, para a falta de discriminação das amostras. Sendo, no sorgo, o efeito do amido gelatinizado mais forte que o efeito da digestibilidade proteica, podendo este efeito ser o reflexo do amido gelatinizado esconder a proteína.

O milho é a amostra que apresenta maior valor de digestibilidade proteica e, consequentemente, os valores de proteína de 0 e 120 de digestão são mais distintos. Neste caso consegue-se uma discriminação em relação à quantidade de proteína, prevalecendo este efeito ao efeito amorfo da gelatinização do amido.

#### 7.3.4 Acompanhamento da digestão sequencial por FT-IR

Mais uma vez, por FT-IR, desta vez dos resíduos, pretendeu estudar-se, isoladamente, o comportamento de cada uma das variedades de farinha face à digestão com pepsina. Utilizou-se, para tal, amostras cruas e cozidas com 0, 30 e 120 minutos de digestão.

Os diagramas de contribuições factoriais (Figura 7.8 B) mostram que, para todas as amostras cruas, a separação ocorre em função da quantidade de proteína ou seja, em função da degradação da proteína da farinha pela pepsina.



**Figura 7.8: (A)** Diagrama de coordenadas factoriais e **(B)** diagrama das contribuições factoriais referentes ao acompanhamento sequencial da digestão por FT-IR de amostras cruas com 0, 30 e 120 minutos de digestão.

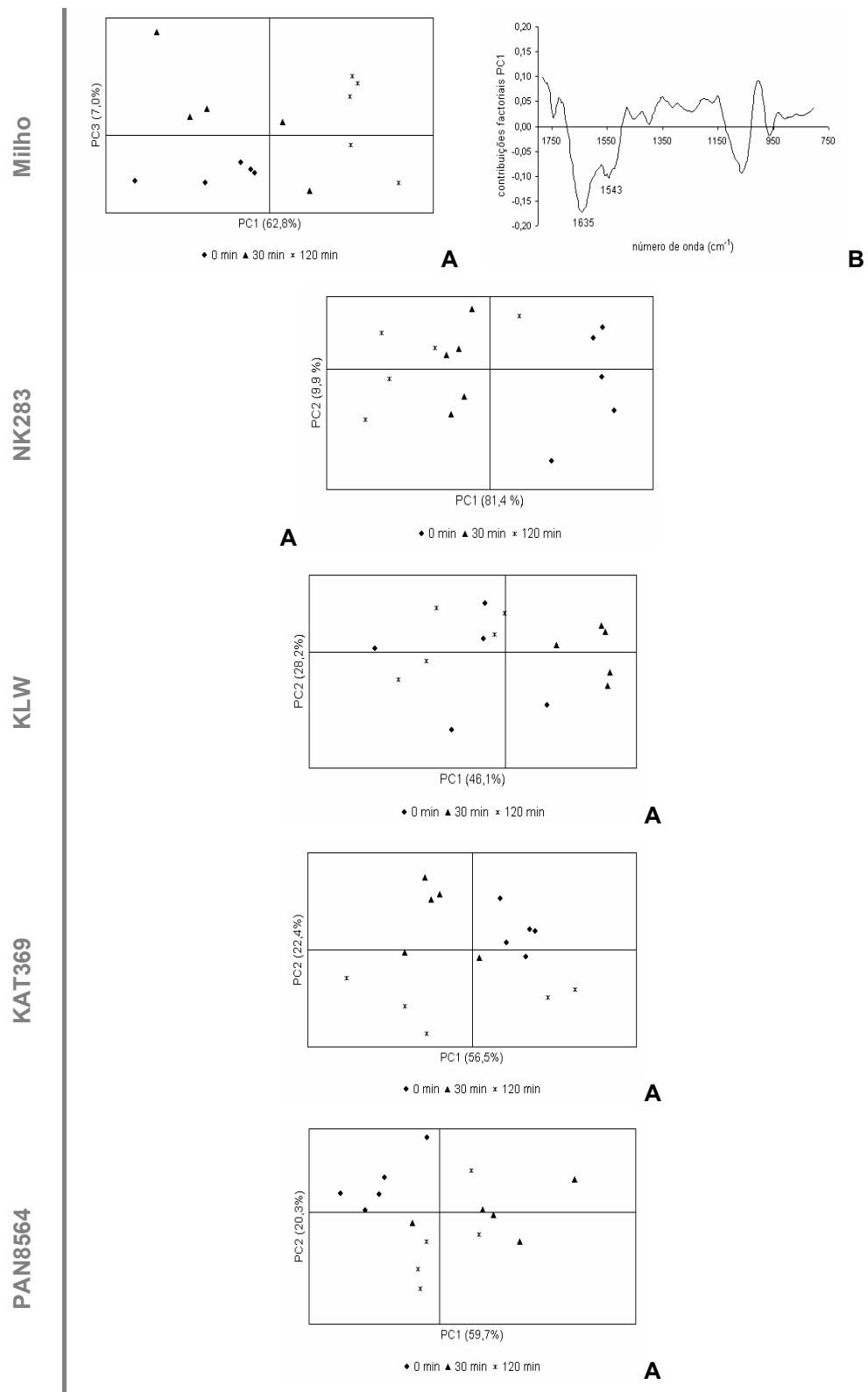
Em relação às amostras de farinha crua, o milho, NK283 e PAN8564 apresentam o mesmo comportamento tanto no diagrama de coordenadas factoriais como no das contribuições factoriais. As amostras localizadas na zona negativa do eixo PC1 (correspondentes ao tempo de digestão 0) estão correlacionadas com os sinais espectroscópicos a 1647 e 1535  $\text{cm}^{-1}$  correspondentes à presença de proteína. Os grupos de amostras com os diferentes tempos de digestão (30 e 120 minutos) vão sendo distribuídas ao longo do eixo PC1. Essa distribuição ocorre da zona negativa para a zona positiva, do referido eixo, à medida que o seu teor em proteína vai diminuindo.

As variedades de sorgo K LW e KAT8564 apresentam um comportamento um pouco diferente no que diz respeito à sua distribuição no diagrama das coordenadas factoriais. Estas variedades também se distribuem da esquerda para a direita, ao longo do eixo PC1, de acordo com o tempo de digestão e, consequentemente, de acordo com o teor em proteína. No entanto, as amostras correspondentes aos tempos de digestão 30 e 120 minutos estão mais próximas, encontrando-se ambas na região positiva do eixo PC1. Para além do teor proteico semelhante esta proximidade poderá ser indicadora de que a pepsina cliva a proteínas das diferentes variedades com velocidades diferentes. A pepsina actua sobre a proteína com uma velocidade superior nos primeiros 30 minutos. Por este motivo a diferença entre amostras de 30 e 120 minutos de digestão não é muito grande.

O mesmo tipo de análise exploratória foi aplicada a amostras de farinha cozida submetida a digestão com pepsina (Figura 7.9).

Dos diagramas de coordenadas factoriais pode verificar-se que a única amostra na que parece haver discriminação entre grupos com diferentes tempos de digestão é o milho. Para além das amostras estarem bastante dispersas devido à gelatinização do amido consegue visualizar-se três grupos correspondentes aos três tempos de digestão. Contrariamente ao que ocorre nas amostras cruas, as amostras cozidas correspondentes aos tempos de digestão 0 e 30 minutos estão localizadas, juntas, na parte negativa do PC1 (Figura 7.9 A).





**Figura 7.9: (A)** Diagrama de coordenadas factoriais e **(B)** diagrama das contribuições factoriais referentes ao acompanhamento sequencial da digestão por FT-IR de amostras cozidas com 0, 30 e 120 minutos de digestão.

Parece, então, que a cinética de digestão é diferente do que no caso da farinha de milho crua. Naquele caso as amostras digeridas 0 e 30 minutos apresentam-se no diagrama um pouco mais distanciadas indicando que, no início, a digestão ocorre mais rapidamente. No caso das amostras de milho cozidas, as amostras com 0 e 30 minutos de digestão estão juntas e mais distanciadas da de 120 minutos de digestão, indicando que no início a digestão é mais lenta. O cozimento parece retardar o início da digestão, para além de diminuir a digestibilidade.

Pelo diagrama das contribuições factoriais pode verificar-se que essas amostras estão correlacionadas com os sinais a 1632 e 1532  $\text{cm}^{-1}$  característicos das proteínas, são então mais ricas em proteína que as amostras que sofreram 120 minutos de digestão, estas, por sua vez, localizadas na região positiva do PC1 (Figura 7.9 B).

No que diz respeito às amostras de sorgo cozidas não se conseguiu discriminação entre amostras com diferentes tempos de digestão. No caso destas amostras a variabilidade causada pela gelatinização do amido supera a variabilidade causada pela diferença entre teores proteicos (Figura 7.9 A). Como se trata de amostras de sorgo a digestibilidade com pepsina não é tão eficiente (baixa digestibilidade proteica) e consequentemente a diferença entre teor proteico não é suficiente, para que haja discriminação entre amostras.

## 7.4 Conclusões

A digestibilidade proteica das amostras de sorgo e de milho, quando cruas, apresentam valores semelhantes. Algumas variedades de sorgo chegam mesmo a apresentar valores de digestibilidade superiores aos do milho.

Dos resultados obtidos a partir das amostras de farinha cozidas verificou-se que, nas variedades de sorgo, os valores de digestibilidade proteica diminuem drasticamente. As variedades K LW e KAT 369, por serem as variedades cuja digestibilidade diminui mais drasticamente com o cozimento,

não deverão ser submetidas a cozimento em água para posteriormente serem consumidas pela população. Estas variedades deverão ser escolhidas para outro tipo de processamento, tais como fermentação ou maltagem.

As alterações sofridas pelos constituintes da farinha de sorgo aquando do cozimento estão na base da redução da digestibilidade proteica. Essa diminuição não está directamente correlacionada com os valores de digestibilidade das farinhas cruas. A digestibilidade proteica da farinha de milho permanece inalterada como o cozimento. A variedade KWL, farinha mais digerível quando crua, é a que sofre maior redução dos valores da digestibilidade quando cozida

O estudo dos resíduos de farinhas cruas por FT-IR permite o acompanhamento do ataque sequencial da pepsina à proteína.

## 7.5 Bibliografia

- Aboubacar, A.; Axtell, J.D.; Huang, C.-P. and Hamaker, B.R. (2001) A rapid protein digestibility assay for identifying highly digestible sorghum lines, *Cereal Chem.*, **78**(2): 160-165.
- Agudelo, R.A.; Alarcón, O.M. E Flíedel, G. (1998) Efecto de la cocción sobre la digestibilidad proteica del sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench), *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, **48**(1): 47-51.
- Armstrong, W.D.; Rogler, J.C. e Featherston, W.R. (1974) Effect of tannin extraction on the performance of chicks fed bird resistant sorghum grain diets, *J. C. Poultry Sci.*, **53**: 2137-2142.
- Axtell, J.D.; Kirleis, A.W.; Hassen, M.M.; Mason, N.d'C., Mertz, E.T. e Munck, L. (1981) Digestibility of sorghum proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **78**(3): 1333-1335.
- Barros A. (1999) Contribution à la sélection et la comparaison de variables caractéristiques. *Tese Doutorado*, Institut Nationale Recherche Agronomique: Paris, France.
- Chibber, B.A.K.; Mertz, E.T. e Axtell, J.D. (1980) In vitro protein digestibility of high tannin sorghum at different stages of dehulling, *J. Agric. Food Chem.*, **28**: 160-161.

- Duodu, K.G.; Nunes, A.; Delgadillo, I.; Parker, M.L.; Mills, E.N.C.; Belton, P.S. and Taylor, J.R.N. (2002) Effect of grain structure and cooking on sorghum and maize in vitro protein digestibility, *J. Cereal Sci.*, **35**: 161-174.
- Eggum, B.O.; Monowar, L.; Bach Knudsen, K.E.; Munck, L. e Axtell, J.D. (1983) Nutritional quality of sorghum foods from Suthan, *J. Cereal Sci.*, **1**: 127-137.
- Hamaker, B.R.; Kirleis, A.W.; Mertz, E.T. e Axtell, J.D. (1986) Effect of cooking on protein profiles and in vitro digestibility of sorghum and maize, *J. Agric. Food Chem.*, **34**: 647-649.
- Hulse, J.H.; Laing, E.M. e Pearson, O.E. (1980) Sorghum and the millets: their composition and nutritive value, Academic Press, New York.
- Kurien, P.P.; Narayanarao, M.; Swaminathan, M. e Subrahmanyam, V. (1960) The metabolism of nitrogen, calcium and phosphorus in undernourished children, *Br. J. Nutr.*, **14**: 339-345.
- MacLean, W.C.; Lopez de Romana, G.; Placko, R.P.; Graham, G.G. (1981) Protein quality and digestibility of sorghum in preschool children: balance studies and plasma free amino acids, *J. Nutr.*, **111**: 1928-1936.
- Mitaru, B.N.; Reichert, R.D.; Blair, R. (1985) Protein and amino acid digestibilities for chickens of reconstituted and boiled sorghum grains varying in tannin contents, *Poultry Sci.*, **64**: 101-106.
- Oria, M.P.; Hamaker, B.R. e Shull, J.M. (1995) Resistance of sorghum alfa-, beta- and gamma- kafirins to pepsin digestion, *J. Agric. Food Chem.*, **43**: 2148-2153.
- Parker, M.L.; Grant, A.; Rigby, N.M.; Belton, P.S. and Taylor, J.R.N. (1999) Effects of popping on the endosperm cell walls of sorghum and maize, *J. of Cereal Science*, **30**: 209-216.
- Rom, D.L.; Shull, J.M.; Chandrashekar, A. and Kirleis, A.W. (1992) Effects of cooking and treatment with sodium bisulfite on in vitro protein digestibility and microstructure of sorghum flour, *Cereal Chem.*, **69** (2): 178-181.
- Vemema, K.; Minekus, M e Havenaar, R. (2003) Advanced *in vitro* models of the gastrointestinal tract – novel tools to study functional foods, Actas do X congresso nacional de biotecnologia (Biotec2003) Lisboa, 20-22.

Weaver, C.A.; Hamaker, B.R. and Axtell, J.D. (1998) Discovery of grain sorghum germ plasm with high uncooked and cooked in vitro protein digestibilities, *Cereal Chem.*, **75**(15): 665-670.



# Calibração do FT-IR para determinação de proteína

## 8.1 Introdução

Quando se pretende realizar um trabalho de digestibilidade proteica *in vitro* é fundamental recorrer a métodos de quantificação de proteína. Caso se possua quantidade de amostra razoável (mínimo: 10 mg de proteína e 0,2-1 g de amostra), a utilização de quantificação de proteína pelo método de Kjeldahl é a mais aconselhada. A metodologia envolvida para aplicação deste método em amostras de cereais está descrita na Norma Portuguesa nº 1996. Este método é moroso, principalmente quando é necessário a análise de um numeroso conjunto de amostras e envolve consumo avolumado de reagentes.

No caso da digestibilidade proteica *in vitro*, desenvolvida ao longo deste trabalho, manuseiam-se amostras de aproximadamente 60 mg de farinha sendo imprescindível recorrer ao método de Kjeldahl. Recorreu-se então a Análise Elementar para determinação de azoto em amostras de farinha. No entanto, este método tona-se dispendioso.

Neste Capítulo, descreve-se um método não convencional de determinação de proteína, recorrendo a espectroscopia de infravermelho (FT-IR) e a análise multivariada (PLS1) (Wold *et al.* 1983). Este método para além de ser extremamente rápido, necessita de quantidades reduzidas de amostra, não é destrutivo (reutilização de amostra) e não é dispendioso.

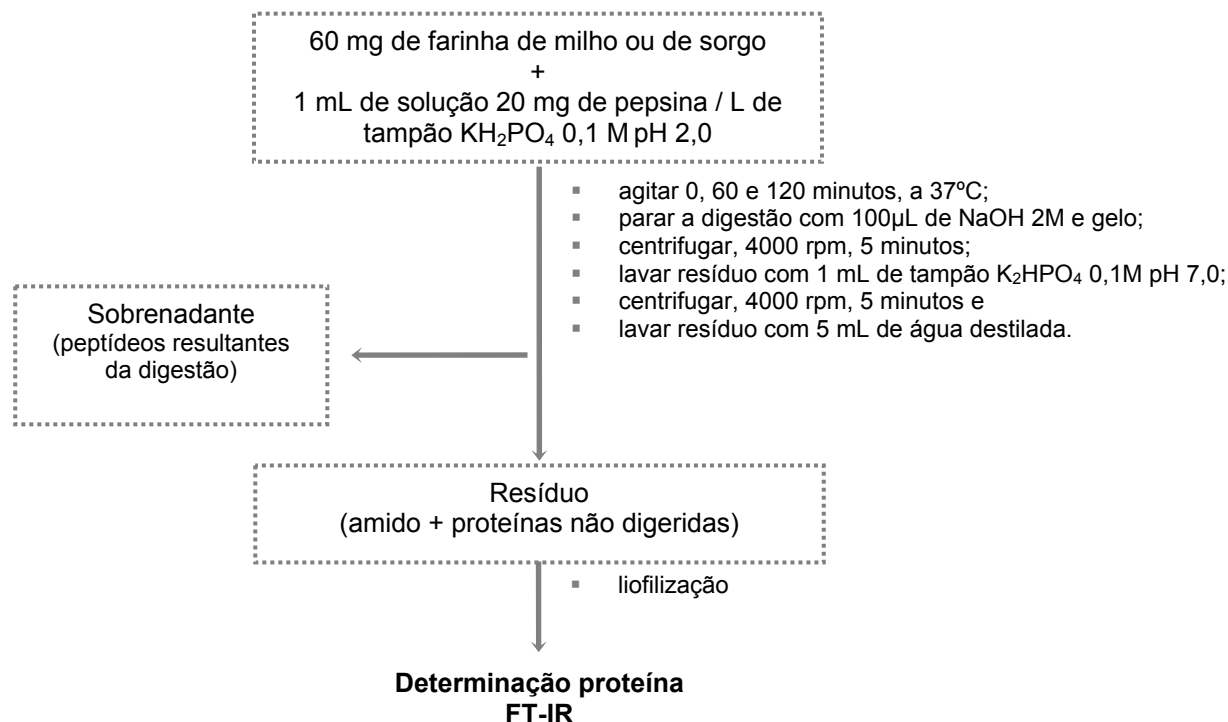
O FT-IR acoplado a PLS1 revelou-se bastante eficaz na quantificação de outros constituintes de diversos sistemas (Coimbra *et al.* 1998, Lopes *et al.* 2000, Barros *et al.* 2001, Duarte *et al.* 2002) e terá potencial na aplicação de determinação de proteína em amostras de farinha de cereais.

## 8.2 Metodologia

- 1º Preparação de amostras com diferentes teores em proteína.
- 2º Determinação da proteína das amostras por Análise Elementar.
- 3º Aquisição dos espectros de FT-IR das amostras.
- 4º Aplicação de PLS1 para criação de um modelo de previsão.
- 5º Aplicação do modelo de calibração a amostras reais.

### 8.2.1 Preparação das amostras

Diversas amostras de farinha foram submetidas a digestão sequencial com pepsina. A digestão foi interrompida a 0, 60 e 120 minutos. Após lavagem da amostra o resíduo não digerido foi liofilizado e posteriormente submetido a análise elementar para determinação de azoto total. O procedimento seguido está descrito na Figura 8.1.



**Figura 8.1:** Fluxograma referente ao procedimento de digestão sequencial *in vitro* para obtenção de proteínas com diferentes concentrações de proteína (adaptado de Weaver *et al.* 1998 e Aboubacar *et al.* 2001).



### 8.2.2 Obtenção de espectros de FT-IR

O espectro de FT-IR de cada uma das amostras foi adquirido e para cada uma das amostras foi determinada o teor em proteína por Análise Elementar.

Os espectros das farinhas foram adquiridos na gama de 4000 a 500  $\text{cm}^{-1}$  com resolução de 8  $\text{cm}^{-1}$  (na gama de infravermelho médio) num espectrómetro Bruker IFS 55 com acessório Golden Gate (sistema de ATR de reflexão única), com acumulação de 256 scans. Foram realizadas cinco réplicas de cada amostra.

Procedimento semelhante foi empregue em amostras novas de forma a confirmar a robustez do modelo.

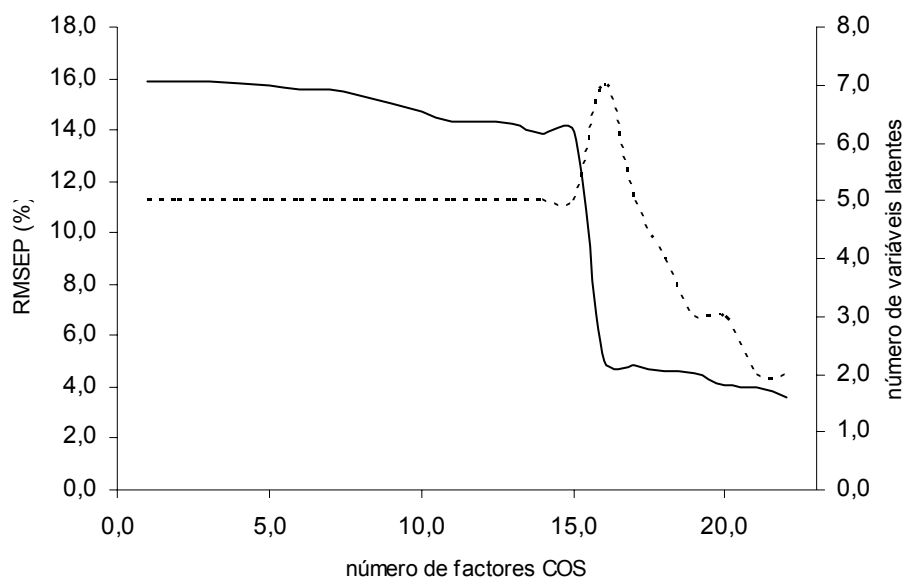
## 8.3 Resultados e discussão

Foi construída uma matriz  $X$  contendo os sinais espectroscópicos obtidos por FT-IR e um vector  $y$  contendo os valores de teor proteico determinados por Análise Elementar. Após ensaios preliminares verificou-se que a região espectral de interesse está compreendida entre 1900 e 700  $\text{cm}^{-1}$ .

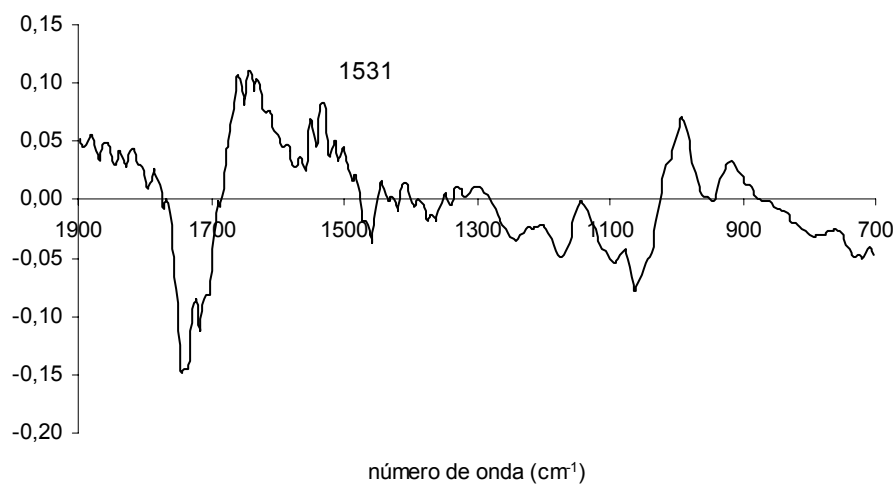
Recorrendo a correcção ortogonal de sinal (COS), e a partir de  $X$  e  $y$ , foram determinados o número de factores ortogonais necessários para descrever o sistema, neste caso foram necessários 22 (Feudale *et al.* 2002). Obteve-se uma matriz  $X'$  que posteriormente foi pré-tratada recorrendo ao método SNV (centrar e reduzir).

A validação cruzada indicou um modelo PLS1 com 2 variáveis latentes (VL) e um erro de calibração de 3,6% (Figura 8.2).

Na Figura 8.3 encontra-se representado o vector **b** do modelo criado e onde se podem identificar as bandas mais relevantes. As bandas localizadas a 1639 e 1532  $\text{cm}^{-1}$  aumentam como o teor em proteína.

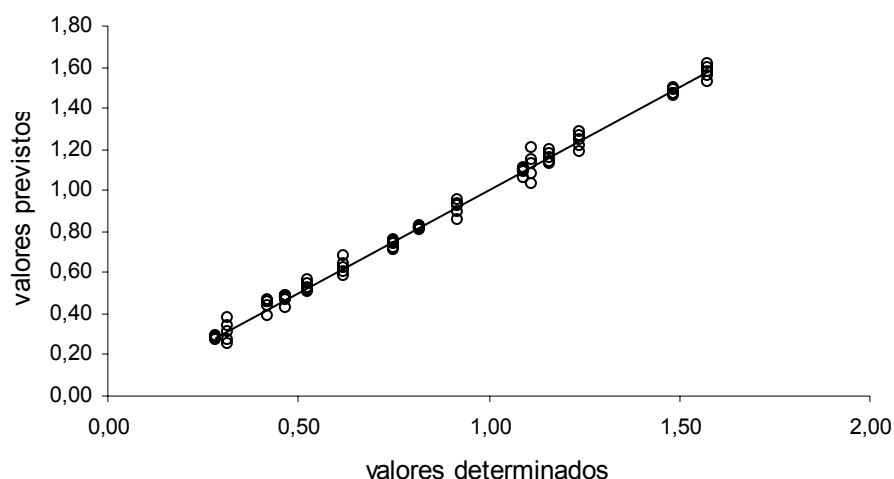


**Figura 8.2:** Representação gráfica do ruído associado ao método de previsão em função do número de fatores COS e do número de variáveis latentes.



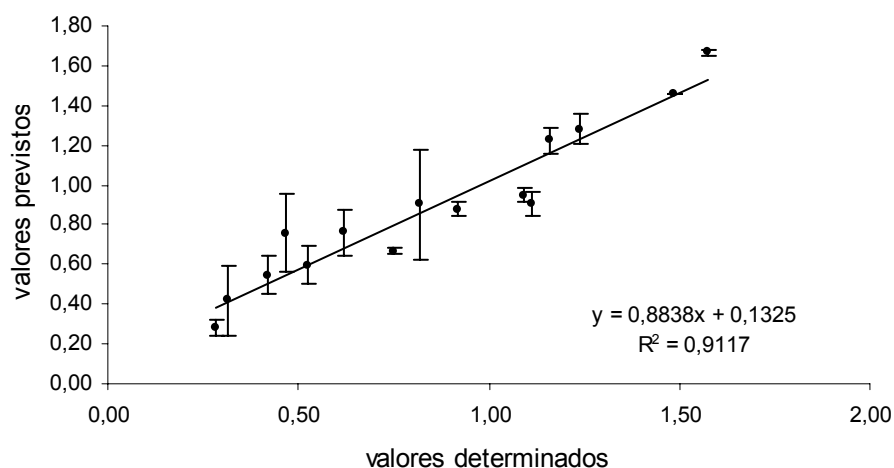
**Figura 8.3:** Vector **b** do modelo de previsão obtido com uma variável latente.

Após construção do modelo de previsão da quantidade de proteína em amostras de farinha, e tendo em conta o erro associado, conseguimos comparar os valores de proteína determinados com os valores de proteína previstos (Figura 8.4).



**Figura 8.4:** Comparação entre os valores de proteína previstos pelo modelo e os valores determinados por Análise Elementar. Amostras utilizadas para construção do modelo de previsão.

De modo a avaliar a robustez do modelo de previsão recorreu-se a uma calibração externa. Para tal, foram adquiridos os espectros de amostras de farinha novas e o seu teor proteico foi determinado recorrendo ao modelo de previsão.



**Figura 8.5:** Comparação entre os valores de proteína previstos pelo modelo e os valores determinados por Análise Elementar. Amostras utilizadas para validação externa.

Os valores calculados foram comparados com os valores determinados, para essas amostras, por Análise Elementar obtendo-se uma coeficiente de correlação de 0,91 ( $R^2$ ) (Figura 8.5).

O mesmo procedimento foi empregue a amostras de farinha cozida, no entanto, os resultados não foram satisfatórios. Uma possível explicação para o insucesso da quantificação de proteína em amostras de farinha cozida poderá ser a perda de homogeneidade do sistema associada à gelatinização do amido aquando do cozimento (problema amplamente discutido no Capítulo 4).

## 8.4 Conclusões

Recorrendo a técnicas espectroscópicas e a métodos quimiométricos foi possível desenvolver um método de previsão para a quantificação de proteína em amostras de farinha crua. Este método revelou ser simples, rápido, pouco dispendioso e bastante preciso para a quantificação do referido constituinte da farinha.

## 8.5 Bibliografia

- Aboubacar, A.; Axtell, J.D.; Huang, C.-P. and Hamaker, B.R. (2001) A rapid protein digestibility assay for identifying highly digestible sorghum lines, *Cereal Chem.*, **78**(2): 160-165.
- Barros, A. S.; Mafra, I.; Ferreira, D.; Cardoso, S.; Reis, A.; Lopes da Silva, J. A.; Delgadillo, I.; Rutledge, D. N.; Coimbra, M.A. (2001) Determination of the degree of methylesterification of pectic polysaccharides by FT-IR using an Outer Product PLS1 regression, *Carbohydr. Polym.*, **50**: 85-94.
- Coimbra, M.A.; Barros, A.; Barros, M.; Rutledge, D.N.; Delgadillo, I. (1998) Multivariate Analysis of Uronic Acid and Neutral Sugars in Whole Pectic Samples by FT-IR Spectroscopy, *Carbohydr. Polym.*, **37**, 241-248.

- Duarte, I.F.; Barros, A.S.; Delgadillo, I.; Almeida, C.; Gil, A. M. (2002) Application of FTIR spectroscopy for the quantification of sugars in mango juice as a function of ripening, *J. Agric. Food Chem.* **50**: 3104-3111.
- Feudale, R.N.; Tan, H. e Brown, S. (2002) Piecewise orthogonal signal correction, *Chem. and Intelligent Lab. Systems*, **63**: 129-138.
- Lopes, M.H.; Pascoal Neto, C.; Barros, A.S.; Rutledge, D.; Delgadillo, I.; Gil, A.M. (2000) Quantitation of aliphatic suberin in *Quercus suber* L. cork by FTIR and solid state  $^{13}\text{C}$  CP/MAS NMR spectroscopies, *Biopolymers (Biospectroscopy)*, **57**, 344-351.
- Norma portuguesa (1982) Determinação do teor de proteína bruta em cereais e leguminosas, *Normas portuguesas* N°1996.
- Weaver, C.A.; Hamaker, B.R. and Axtell, J.D. (1998) Discovery of grain sorghum germ plasm with high uncooked and cooked in vitro protein digestibilities, *Cereal Chem.*, **75**(15): 665-670.
- Wold, S.; Martens, H., Wold; H. (1983) in A. Ruhe e B. Kägström (Eds.), *Lecture Notes in Mathematics. Proceedings of the Conference Matrix Pencils*, March 1982, Heidelberg, Springer Verlag, 286-293.



# Digestibilidade sequencial *in vitro*

## 9.1. Introdução

Muitos estudos têm vindo a ser desenvolvidos na tentativa de compreender as causas da redução da digestibilidade do sorgo com o cozimento. Diversos trabalhos científicos foram publicados acerca do tema e apontam diversos factores como sendo os responsáveis por tal fenómeno. No entanto muita da informação parece insuficiente ou até mesmo contraditória, continuando sem se saber qual ou, mais correctamente, quais os factores que estão por trás da reduzida digestibilidade do sorgo cozido.

Como foi referido anteriormente as principais causas apontadas para a redução da digestibilidade com o cozimento podem ser subdivididas em exógenas e endógenas. Neste capítulo vão ser abordados dois factores, um endógeno e um exógeno, que a nosso ver, parecem ser indissociáveis: inter-cruzamento entre proteínas e estrutura do corpo proteico.

### 9.1.1 Inter-cruzamento entre proteínas via S-S

Axtell *et al.* (1981) e Hamaker *et al.* (1986), partindo dos pressupostos que o cozimento induz a formação de pontes dissulfeto entre as proteínas de sorgo e que o sorgo contem níveis superiores de ligações dissulfeto que o milho, sugeriram que o estabelecimento de ligações S-S estaria na base da diminuição da digestibilidade do sorgo com o cozimento.

Hamaker *et al.* (1987) testaram, então, o efeito da presença de agentes redutores nos valores de digestibilidade do sorgo e de outros cereais. Verificaram que a utilização de 2-mercaptoetanol (agente redutor) promove um aumento de 11% na digestibilidade do sorgo cru e de 25,1% na do sorgo

cozido. A digestibilidade do sorgo cozido passou assim a assumir valores comparados aos do sorgo cru e aproximados aos dos outros cereais. Verificaram ainda que a digestibilidade dos outros cereais estudados (arroz, trigo e cevada) não é tão incrementada pela utilização de agentes redutores.

Esses resultados permitiram-lhes concluir que durante o cozimento ocorre formação de ligações dissulfeto e estas ligações podem ser a causa da diminuição da digestibilidade.

O ataque da pepsina aos corpos proteicos do sorgo foi acompanhada por microscopia electrónica de varrimento (SEM) e pode verificar-se que durante a digestão ocorreu um extenso ataque aos corpos proteicos do sorgo cru, enquanto que, no sorgo cozido, os corpos proteicos mantiveram-se praticamente intactos (Rom *et al.* 1992). Quando o sorgo foi cozido na presença de agente redutor o ataque enzimático aos seus corpos proteicos é semelhante ao que ocorre no sorgo cru.

Em 1994, Hamaker *et al.* verificaram que a formação de pontes dissulfeto ocorre, preferencialmente, entre moléculas de kafirinas  $\gamma$  e kafirinas  $\beta$  situadas na superfície dos corpos proteicos, impedindo assim que a acção enzimática da pepsina atinja as kafirinas  $\alpha$ , localizadas no interior dos corpos proteicos. No entanto, há exemplos de proteínas de cereais nas quais a formação de pontes dissulfeto não origina diminuição da digestibilidade. Na produção de pão, aquando do processo de amassar a farinha com água é promovida a formação de pontes S-S entre as proteínas do trigo e a digestibilidade proteica não é reduzida.

Oria *et al.* (1995) verificaram que as kafirinas  $\alpha$  são as prolaminas menos digeríveis, quando se estuda o grão na sua totalidade. No entanto, Hamaker *et al.* (1986) verificaram que, quando isoladas são bastante digeríveis e mantêm esta característica após o cozimento. O mesmo não se verifica com as kafirinas  $\beta$  e  $\gamma$  que, com o cozimento tornam-se mais resistentes a digestão.

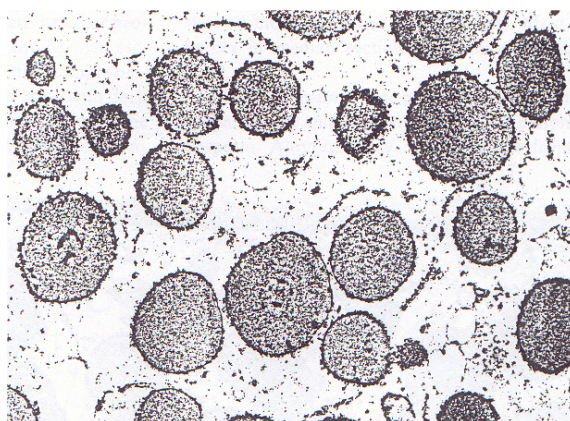


### 9.1.2 Outro tipo de inter-cruzamento entre proteínas

Outros estudos indicam a formação de proteínas de 45 e 47 kDa com o cozimento (Duodu *et al.* 2002, Nunes *et al.* 2004). De acordo com estes estudos, estas proteínas, resistentes às condições redutoras, parecem estar relacionadas com a diminuição da digestibilidade com o cozimento.

### 9.1.3 Estrutura do corpo proteico

No que diz respeito à distribuição das kafirinas nos corpos proteicos, Shull *et al.* (1991 e 1992) detectaram, por microscópica electrónica de transmissão, zonas dos corpos proteicos mais escuras e outras zonas mais claras; por microscopia imuno-electrónica determinaram que as regiões centrais mais claras corresponderiam à presença de kafirina  $\alpha$  enquanto que zonas mais escuras, na periferia do corpo proteico, corresponderiam à presença de kafirina  $\gamma$  e  $\beta$ . Foram também detectadas regiões escuras inclusas no corpo proteico, essas inclusões foram atribuídas à presença de kafirina  $\gamma$ .



**Figura 9.1:** Imagem de TEM de corpos proteicos de sorgo no endosperma amiláceo (Shull *et al.* 1992).

Os mesmos autores verificaram, também, que os corpos proteicos mais periféricos apresentam maior percentagem em kafirinas  $\alpha$  do que os corpos proteicos centrais que apresentam mais teor em kafirinas  $\beta$  e  $\gamma$ .

Oria *et al.* (1995) propõem que as kafirinas  $\alpha$  são digeridas mais lentamente devido à sua localização no interior do corpo proteico. As kafirinas  $\beta$  e  $\gamma$  são as primeiras a serem degradadas, uma vez que se situam na periferia dos corpos proteicos. Com o cozimento, a formação de ligações S-S entre as kafirinas  $\beta$  e  $\gamma$  torna-as mais resistentes ao ataque enzimático e, consequentemente, ao acesso às kafirinas  $\alpha$  é dificultado.

Foi criado um mutante de sorgo cuja digestibilidade não é afectada com o cozimento. Contrariamente ao que ocorre com as espécies de sorgo comuns, as análises por SDS-PAGE e ELISA, mostraram que nessa espécie de sorgo a digestão das kafirinas  $\alpha$  ocorre muito rapidamente e primeiro que as restantes kafirinas (Weaver *et al.* 1998 e Oria *et al.* 2000).

Recorrendo a microscopia electrónica de transmissão (TEM), Oria *et al.* (2000) analisaram essa espécie de sorgo e verificaram que os seus corpos proteicos apresentavam uma forma irregular, portanto muito diferente das outras espécies de sorgo. Os corpos proteicos apresentavam invaginações profundas que, por vezes, alcançam a parte central dos corpos proteicos formando lóbulos irregulares. Nestes corpos proteicos não estavam presentes as zonas escuras periféricas que aparecem nas espécies normais, e que apareciam inclusões escuras na base das pregas. Weaver *et al.* (1998) verificaram ainda que após 30 minutos de digestão com pepsina, a digestibilidade das kafirinas  $\alpha$  desta espécie era 2,5 vezes superior à das variedades comuns.

Como foi referido anteriormente, a localização periférica das kafirinas  $\gamma$  e  $\beta$  nos corpos proteicos impede a digestão das outras kafirinas (Oria *et al.* 1995). Com base nestas evidências, estes autores concluíram que a alteração estrutural dos corpos proteicos e a mudança da localização das kafirinas  $\gamma$  para inclusões na base das pregas, estão directamente relacionadas com o incremento da digestibilidade proteica.

Neste capítulo vai ser investigada a formação de ligações inter-proteína e, de uma forma indirecta, a estrutura do próprio corpo proteico através de

um estudo que assenta na digestibilidade sequencial com pepsina, acompanhado por SDS-PAGE.

## 9.2. Metodologia

- 1º Preparação das amostras de farinha crua e cozida.
- 2º Ensaio da digestibilidade sequencial *in vitro*.
- 3º Extracção das proteínas não digeridas.
- 4º Estudo das proteínas não digeridas por SDS-PAGE.
- 5º Estudo da eficiência da extracção por FT-IR.

### 9.2.1 Preparação das amostras

Os grãos de Milho, NK283, KIW, KAT369 e PAN8564 foram moídos e peneirados até uma granulometria  $\leq 400 \mu\text{m}$ .

Para a obtenção de farinha cozida, as amostras de farinha foram misturadas com água na proporção de 1:10 e colocadas em banho fervente durante 20 minutos. Após o arrefecimento das amostras, à temperatura ambiente, estas foram congeladas e em seguida liofilizadas de forma a não haver perdas de massa.

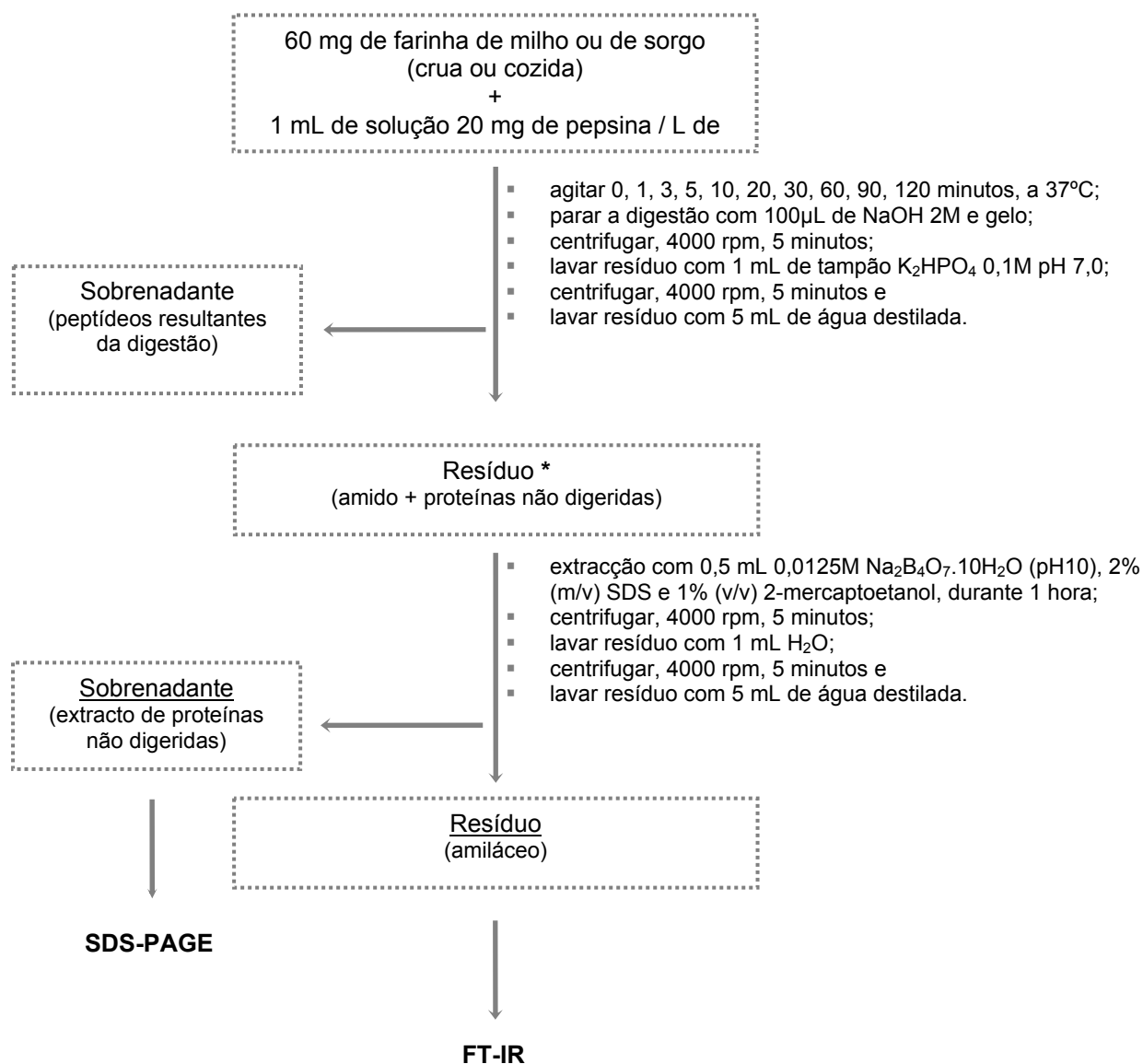
### 9.2.2 Digestibilidade sequencial

Seguindo o procedimento descrito anteriormente (8.2.2) para determinação da digestibilidade, procedeu-se a um estudo sequencial da digestibilidade proteica. Para tal, a reacção com pepsina foi interrompida por diminuição de pH (adição de NaOH) e diminuição de temperatura após: 0, 1, 3, 5, 10, 20, 30, 60, 90 e 120 minutos (adaptado de Weaver *et al.* 1998 e Aboubacar *et al.* 2001).

Os resíduos obtidos foram submetidos a uma extracção de proteína total de modo permitir o estudo das proteínas não digeridas. A referida extracção

efectuou-se com uma solução de 0,0125M  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  (pH10), 2% (m/v) SDS e 1% (v/v) 2-mercaptoetanol sob agitação magnética durante uma hora (Wallace *et al.* 1990).

Paralelamente efectuou-se um estudo da digestão sequencial utilizando t-butanol como extractor das proteínas não digeridas. Neste estudo foram apenas utilizados quatro tempos de digestão (0, 30, 60 e 120 minutos).



\* A partir deste passo efectuou-se um ensaio paralelo, com 0, 30, 60 e 120 minutos de extracção, utilizando como solução extractora 60% de t-butanol.

**Figura 9.2:** Fluxograma referente ao procedimento da digestão sequencial *in vitro* e extracção das proteínas não digeridas.

Após centrifugação (centrífuga Kubota 2010) a 4000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante, contendo as proteínas não digeridas, foi separado do resíduo amiláceo.

O extracto proteico foi analisado por SDS-PAGE e o resíduo, depois de lavado e liofilizado, foi analisado por FT-IR (Figura 9.2).

Para ambas as extracções foi efectuada uma amostra controlo (T) que foi submetida ao mesmo procedimento das restantes amostras, omitindo-se apenas, a adição de pepsina.

### 9.2.3 Análise dos extractos proteicos por SDS-PAGE

Os extractos proteicos foram analisados por SDS-PAGE. A separação electroforética foi efectuada num sistema Mini Protean II (BioRad) em gel de poliacrilamida na presença de dodecil-sulfato de sódio como agente dissociante (Shewry *et al.* 1995). Ensaio preliminares revelaram que a composição ideal do gel seria: 15% de acrilamida e 0,4% de bis-acrilamida em Tris/HCl 1,5 M, pH 8,8 na presença de SDS 0,1% (m/v). O gel concentrador era constituído por 4% de acrilamida e 0,4% de bis-acrilamida em Tris/HCl 0,5 M, pH 6,8 na presença de SDS 0,1% (m/v). A polimerização dos géis foi iniciada com N,N,N',N'- tetrametiletenodiamina (TEMED) 42,5 mM e catalisada por persulfato de amónio (APS) 0,05% (m/v).

A 10 µL de amostra foi adicionado igual volume de solução desnaturante constituída por Tris 62,5 mM, SDS 2% (m/v), glicerol 10% (v/v), azul de bromofenol 0,01% (m/v) e 2-mercaptoetanol 5% (v/v). A mistura foi fervida 5 minutos para promover a desnaturação das proteínas e em seguida foram aplicados 7µL no gel. A separação electroforética decorreu durante 45 minutos a 150 V (fonte BioRad Power-Pac 300) em solução de Tris 25 mM, glicina 0,192 M, pH 8,3 e SDS 0,1%.

Os perfis electroforéticos foram obtidos de acordo com o descrito no Capítulo 5.

### 9.2.4 Determinação de proteína para cálculo da digestibilidade

Após a digestão com pepsina, os resíduos após a digestão com pepsina foram liofilizados. Para a determinação do azoto total nas amostras cruas recorreu-se à calibração efectuada por FT-IR / PLS1, para as amostras cozidas recorreu-se à análise elementar. Neste caso, para a conversão do azoto total em proteína bruta não digerida, utilizou-se o factor de convencional para cereais de 6,25 (Norma Portuguesa nº 1996).

Para o ensaio em branco (t0) adicionou-se, simultaneamente, pepsina e NaOH, não chegando, portanto, a haver digestão.

### 9.2.5 Cálculo dos valores de digestibilidade

A percentagem de digestibilidade foi então calculada através da fórmula:

$$\frac{[N_0] - [N_{120}]}{[N_0]} \times 100$$

em que  $N_0$  é o teor de azoto na amostra sem digestão e  $N_{120}$  o teor em azoto da amostra com 120 minutos de digestão com pepsina.

### 9.2.6 Ensaio de FT-IR

Os resíduos amiláceos, resultantes da extracção, foram analisados por FT-IR. Os espectros foram adquiridos na gama de 4000 a 500  $\text{cm}^{-1}$  com resolução de 8  $\text{cm}^{-1}$  (na gama de infravermelho médio) num espectrómetro Bruker IFS 55 com acessório Golden Gate (sistema de ATR de reflexão única), com acumulação de 256 scans. Foram realizadas cinco réplicas de cada amostra.

Tal como descrito anteriormente, os espectros de FT-IR foram submetidos a uma análise exploratória – análise em componentes principais (PCA), utilizando um programa desenvolvido por Barros (1999).

## 9.3 Resultados e discussão

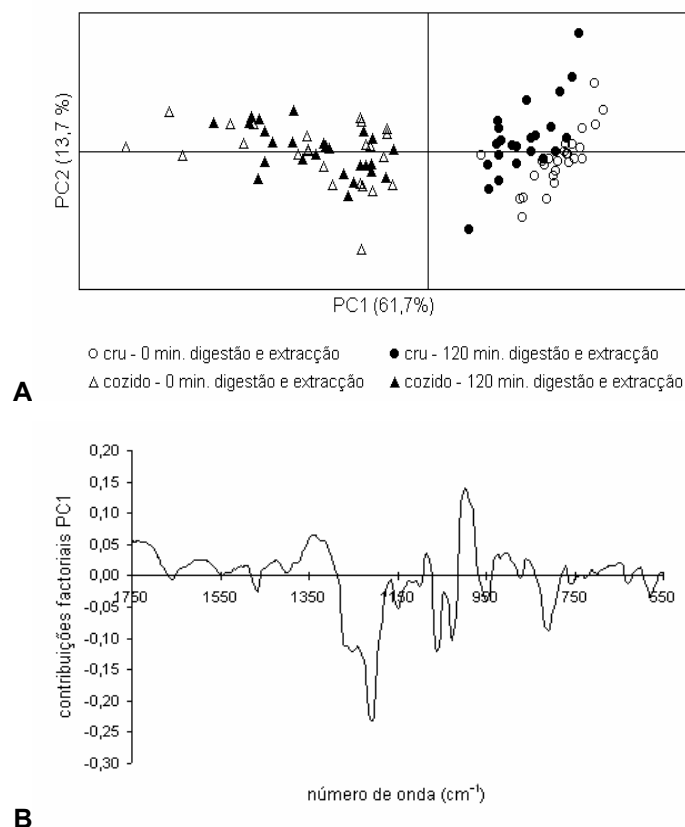
### 9.3.1 Determinação da eficiência do método de extracção

Antes de se dar início à interpretação dos resultados electroforéticos referentes às proteínas extraídas dos resíduos obtidos após digestão sequencial, e de modo a determinar a representatibilidade do extracto proteico, determinou-se a eficiência do extractante utilizado (0,0125M  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  (pH10), 2% (m/v) SDS e 1% (v/v) 2-mercaptoetanol).

Para avaliar se a extracção proteica foi completa os resíduos amiláceos resultantes da extracção proteica foram analisados por FT-IR e comparados recorrendo a técnicas de análise multivariada.

Por análise multivariada conseguiram-se discriminar apenas dois grupos de amostras: amostras cruas e amostras cozidas. Não se verificou a discriminação entre amostras com 0 e com 120 minutos de extracção. Contudo, a análise visual dos espectros mostra que parece existir uma quantidade residual de proteína em todas as amostras (sinais espectroscópicos pouco intensos em torno de 1650 e 1550  $\text{cm}^{-1}$  correspondentes às Amidas I e II). O facto de não haver discriminação em função da pequena quantidade de proteína remanescente sugere que essa proteína residual é a mesma em todas as amostras (Figura 9.3 A).

Como esperado, os diagrama das contribuições factoriais mostra que os dois grupos obtidos são discriminados exclusivamente devido a sinais na região característica do amido (1100-900  $\text{cm}^{-1}$ ) (Figura 9.3 B).



**Figura 9.3:** **(A)** Diagrama de coordenadas factoriais de PC1 vs PC2 e **(B)** diagrama das contribuições factoriais do PC1 referentes aos resíduos crus e cozidos não digeridos ( $t_0$ ) e digeridos durante 120 minutos ( $t_{120}$ ) após extracção com solução extractora de proteínas (solução de Wallace).

A ausência, nesse diagramas, de sinais referentes à absorção de proteína indica que a proteína não extraída é similar nas amostras cruas e cozidas e, conseqüentemente, a análise dos extractos por SDS-PAGE é representativa das proteínas de reserva.

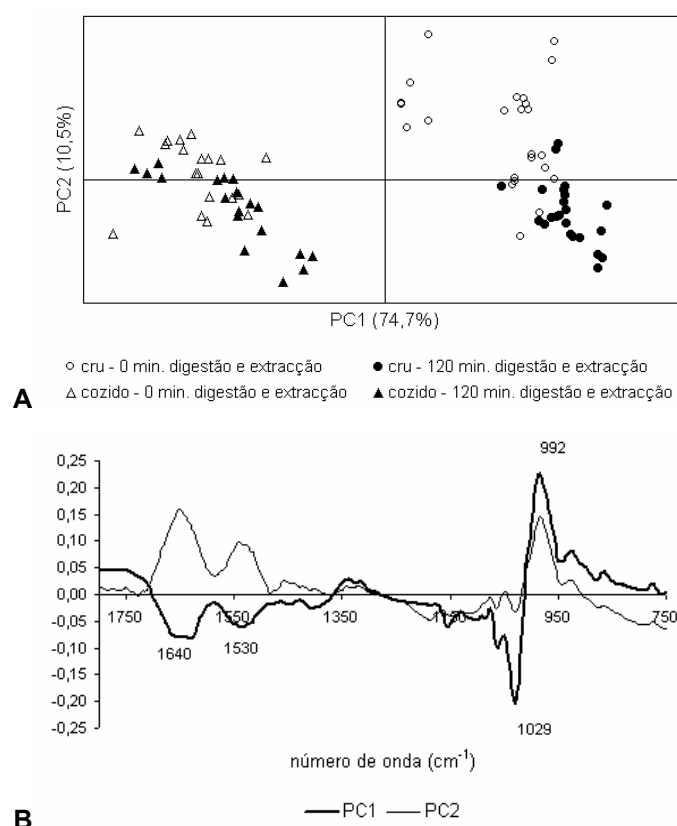
A extracção das proteínas foi também testada com o solvente vulgarmente utilizado na extracção sequencial de prolaminas - t-butanol 60%. Este extractante não cliva as ligações S-S, permitindo a visualização dos oligómeros não reduzidos.

A discriminação entre amostras cruas e cozidas, extraídas com t-butanol, ocorre através do eixo PC1 (Figura 9.4 A) e é devida a sinais de proteína (1640 e 1530  $\text{cm}^{-1}$ ) e, na região da *impressão digital*, a sinais correspondentes a amido gelatinizado (Figura 9.4 B). A contribuição da proteína para a discriminação, para além de apresentar peso inferior ao do



amido, pode ser devida a alterações conformacionais induzidas pelo cozimento, como se pode inferir pela forma do sinal na região de 1650-1640  $\text{cm}^{-1}$  correspondente à banda Amida I.

Como se pode verificar, também através do diagrama de coordenadas factoriais (PC1 vs. PC2), em relação às amostras cruas há uma tendência para a discriminação, através de eixo PC2, entre os diferentes tempos de digestão (Figura 9.4 A).



**Figura 9.4:** (A) Diagrama de coordenadas factoriais de PC1 vs PC2 e (B) diagrama das contribuições factoriais do PC1 e PC2 referentes aos resíduos crus e cozidos não digeridos ( $t_0$ ) e digeridos durante 120 minutos ( $t_{120}$ ) após extracção com 60% t-butanol.

O diagrama das contribuições factoriais, mostra que a discriminação através do eixo PC2 (responsável pela explicação de 10,5% da informação), é devida aos sinais correspondentes às proteínas (1640 e 1530  $\text{cm}^{-1}$ ). As amostras localizadas na região PC2 positiva, correspondentes às amostras cruas ( $t_0$ ), estão correlacionadas com os sinais de proteína, apresentam, então, um teor proteico superior (Figura 9.4 B).

Verificou-se que a proteína dos resíduos com 0 minutos de digestão mesmo em amostras cruas, não foi completamente extraída e podendo concluir-se que este tipo de extracção não é eficiente e o extracto proteico obtido não é representativo da proteína total.

Este estudo permitiu concluir que a solução de 0,0125M  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  (pH10), 2% (m/v) SDS e 1% (v/v) 2-mercaptoetanol é mais eficiente na extracção total das prolaminas dos resíduos não digeridos.

No entanto, os aglomerados de elevado peso molecular não são visualizados uma vez que são reduzidos pelo meio extractante redutor. Para os estudar, tem de se analisar em meio não redutor, como é o caso da extracção com t-butanol, tendo sempre em conta que o extracto poderá não ser representativo.

### 9.3.2 Digestão sequencial - extracção de Wallace

#### 9.3.2.1 Amostras de farinha crua

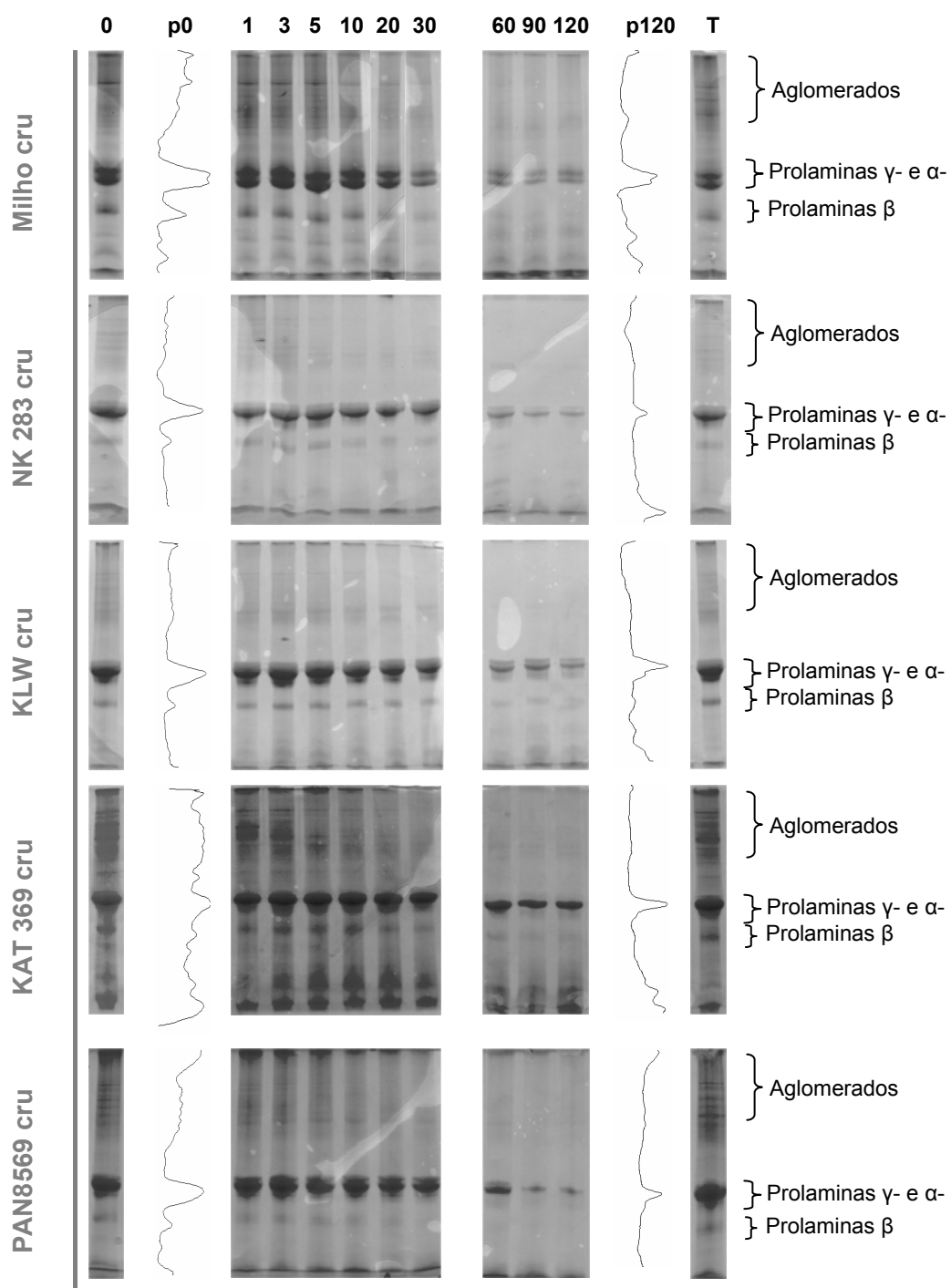
A análise dos géis, referentes aos extractos contendo as proteínas que resistiram aos diversos tempos de digestão, revelou que tanto o milho como o sorgo crus comportam-se de forma similar. Por comparação com electroforegramas apresentados no Capítulo 6, pode verificar-se que esses extractos correspondem à fracção de prolaminas das amostras.

As Figuras 9.5 e 9.6 mostram alterações das proteínas ao longo da digestão com pepsina. Na Figura 9.5 são apresentados os electroforegramas enquanto que na Figura 9.6 estão apresentadas as variações das áreas das bandas electroforéticas (aglomerados de elevado peso molecular,  $\gamma + \alpha$  e  $\beta$ ) ao longo da digestão.

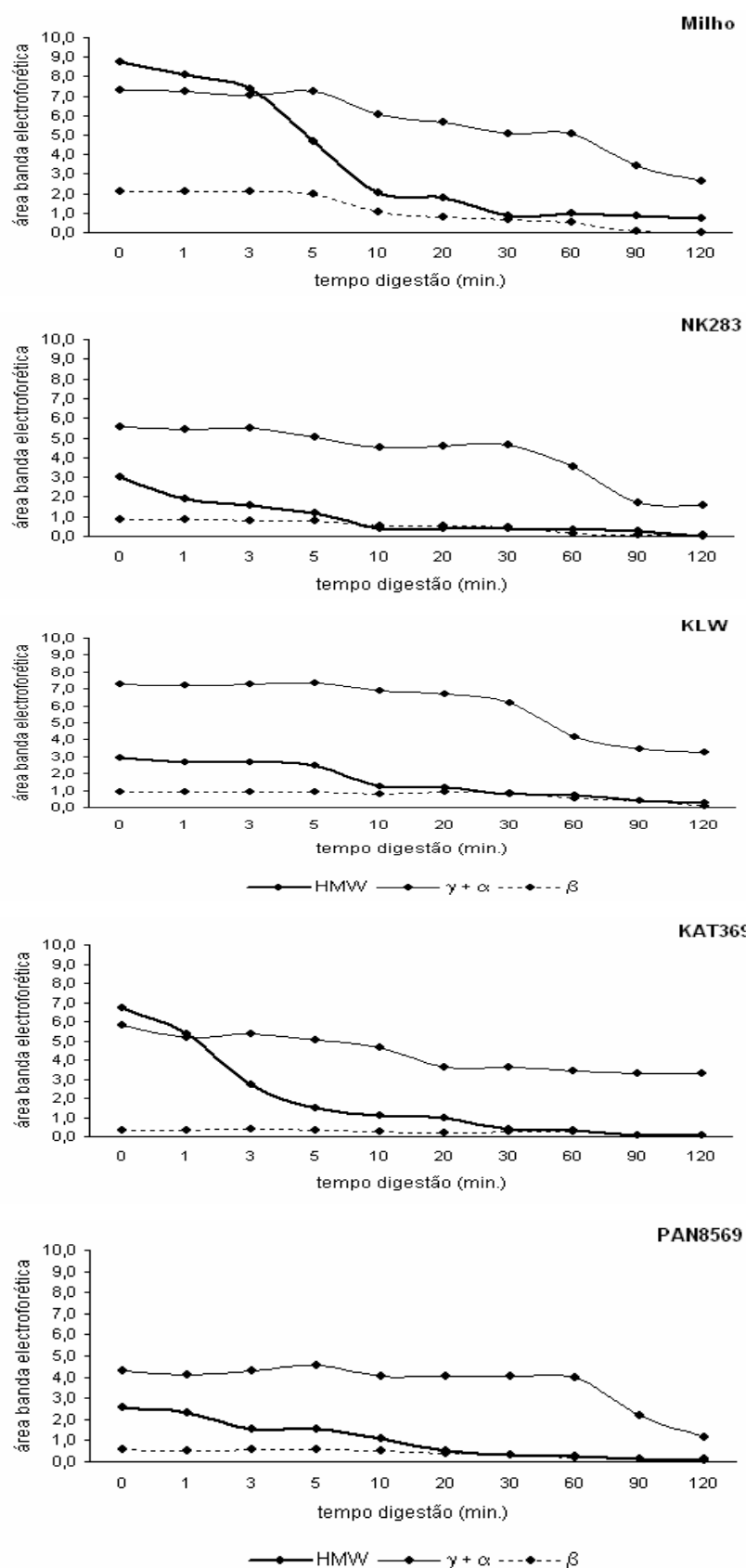
Os aglomerados proteicos de elevado peso molecular parecem ser as primeiras proteínas a serem atacadas pela pepsina. A diminuição destas proteínas no milho é extremamente rápida. Nesta variedade, após 3 minutos observa-se um decaimento vertiginoso até aos 10 minutos de digestão.

No caso do milho, NK 283, KAT 369 e PAN 8564 a digestão dos monómeros  $\gamma$  e  $\alpha$  começa após 5-10 minutos de se dar início à digestão. Na

variedade K LW a digestão desses monómeros começa apenas após 30 minutos de digestão. A banda electroforética correspondente a estes monómeros desta variedade parecem ser mais resistentes.



**Figura 9.5 :** Electroforegramas correspondentes à digestão sequencial de farinha de milho e de sorgo cruas. Junto aos trilhos electroforéticos das amostras com 0 e 120 minutos são apresentados os respectivos perfis electroforéticos (p0 e p120, respectivamente).



**Figura 9.6 :** Variação das áreas das bandas electroforéticas ao longo do tempo de digestão; resultados referentes a farinha crua.

Após 120 minutos de digestão, a prolamina  $\beta$  do milho, NK 283 e PAN 8564 é digerida completamente, enquanto que nas variedades K LW e KAT 369 este monómero persiste até ao final da digestão (120 minutos).

A velocidade de digestão da prolamina  $\beta$  é superior nas variedades de sorgo NK 283 e PAN 8564, isto porque após 60 minutos essa proteína é degradada totalmente. No milho, o referido monómero, ainda é detectado embora que em quantidades vestigiais, após 90 minutos de digestão.

### 9.3.2.2 Amostras de farinha cozida

As Figuras 9.7 e 9.8 mostram alterações das proteínas ao longo da digestão com pepsina. Na Figura 9.7 são apresentados os electroforegramas enquanto que na Figura 9.8 estão apresentadas as variações das áreas das bandas electroforéticas (aglomerados de elevado peso molecular,  $\gamma + \alpha$  e  $\beta$ ) ao longo da digestão.

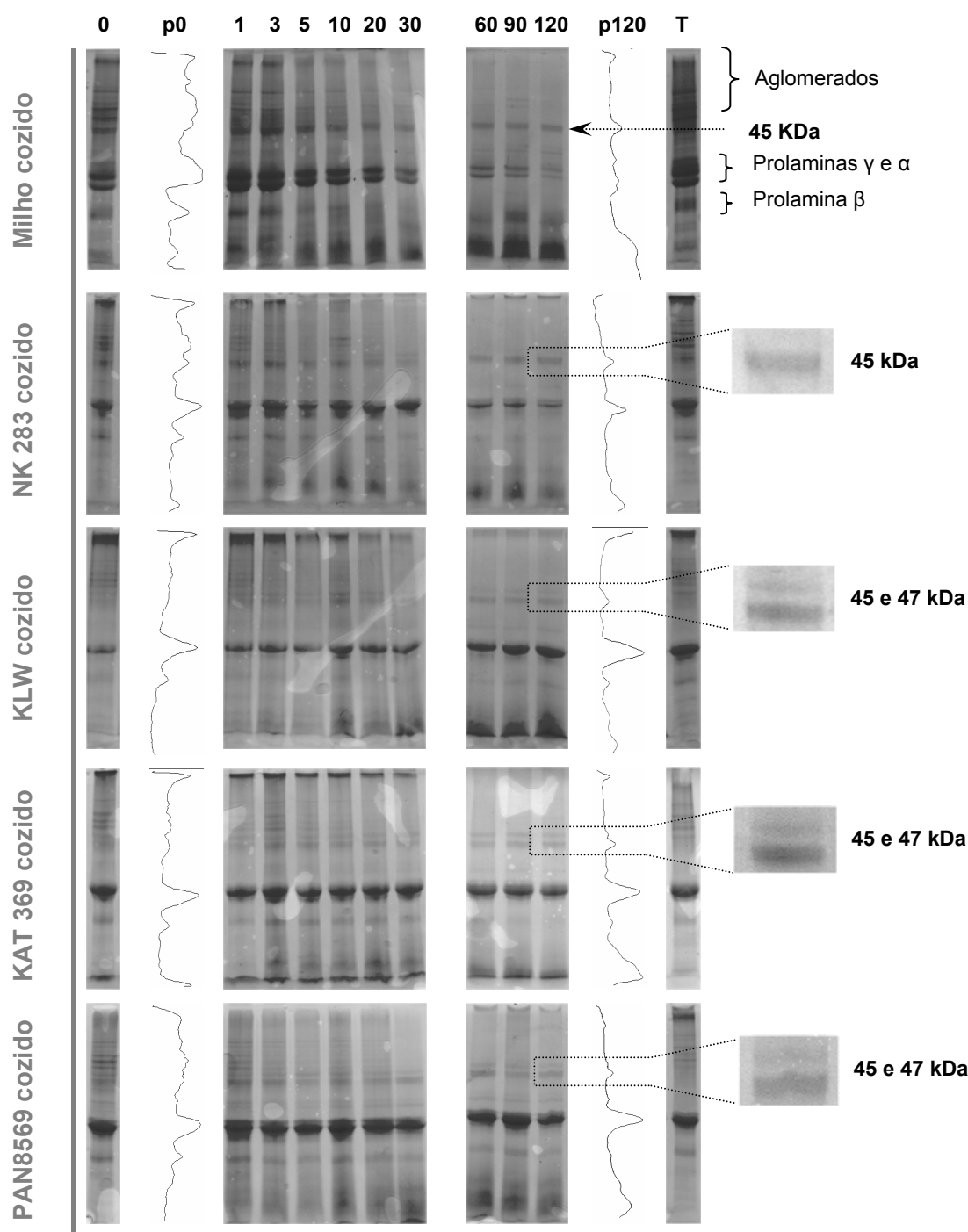
A ordem pela qual a digestão das proteínas das amostras cozidas se processa é muito semelhante à ordem de digestão das proteínas das amostras cruas. Contudo, podem ser assinaladas diferenças fundamentais nos perfis electroforéticos correspondentes às amostras cozidas.

Como se pode verificar comparando as Figuras 9.5 e 9.7 e mais, precisamente, nos trilhos electroforéticos assinalados com T (Testemunha) o cozimento das farinhas em água induz um incremento na fracção de aglomerados de elevado peso molecular. Este incremento é notório tendo em conta que a experiência foi desenvolvida em meio redutor.

Tanto nas amostras de milho como de sorgo NK 283, surge uma proteína de 45 kDa que se mantém presente nas amostras até ao tempo final de digestão. Esta proteína, previamente identificada por Duodu *et al.* (2002), resiste tanto à digestão com pepsina durante 120 minutos como a condições redutoras utilizadas aquando da extracção.

Nas variedades K LW, KAT 369 e PAN 8564 juntamente com a proteína de 45 kDa surge uma outra de peso molecular semelhante (47 kDa). Estes

oligómeros são mais evidentes nas amostras de sorgo com 120 minutos de digestão do que na amostra de milho correspondente.



**Figura 9.7 :** Electroforegramas correspondentes à digestão sequencial de farinha de milho e de sorgo cozida. Junto aos trilhos electroforéticos das amostras com 0 e 120 minutos são apresentados os respectivos perfis electroforéticos (p0 e p120, respectivamente).

Como foi referido no Capítulo 7, a farinha de milho cozida apresenta valores de digestibilidade superiores comparativamente às amostras de sorgo cozidas. Pode verificar-se pelo estudo de digestão sequencial desta amostra que, após 120 minutos de digestão, esta amostra é a que apresenta bandas electroforéticas, correspondentes aos monómeros, mais ténues.

No que diz respeito ao sorgo, a variedade NK 283 é das amostras de sorgo cozidas a que apresenta valores de digestibilidade superiores. Esta amostra é a que apresenta no trilho correspondente a 120 minutos de digestão as bandas electroforéticas, correspondentes aos monómeros, menos intensas.

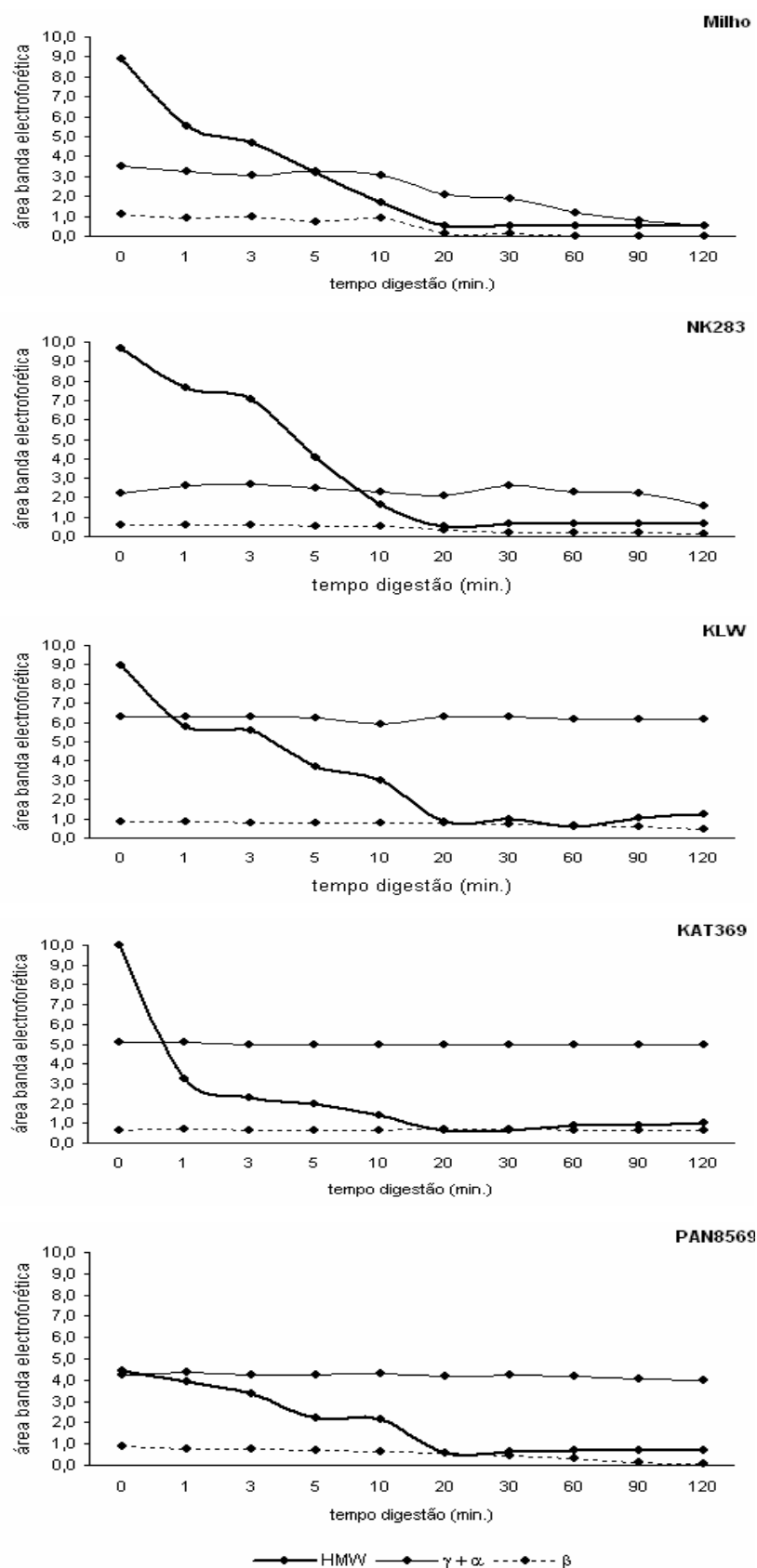
As amostras K LW, KAT 369 e PAN 8564, com valores de digestibilidade inferiores, apresentam no trilho correspondente a 120 minutos de digestão maior intensidade da banda correspondente aos monómeros  $\gamma$ ,  $\alpha$  e  $\beta$ . Para além dos monómeros, estas amostras apresentam ainda as bandas electroforéticas correspondentes às proteínas de 45 e 47 kDa extremamente intensas.

De um modo geral, nas amostras de sorgo cozidas os aglomerados são a única fracção proteica que parece variar. Só se verifica redução das quantidades de monómeros no caso do milho.

A diminuição dos valores de digestibilidade proteica com o cozimento podem estar associadas à formação de proteínas de 47 e 45 kDa que de alguma forma estão protegidas da acção de agentes redutores e de actividade enzimática.

Sabe-se que estas proteínas resistentes à digestão foram também detectadas em amostras de farinha submetidas a autoclavagem. Portanto essas proteínas surgem também quando a proteína é submetida a temperaturas elevadas na ausência de água (Correia, 2003).

Estas proteínas foram extraídas directamente a partir da banda electroforética e em seguida o extracto foi submetido a diversos tratamentos redutores e dissociantes: 2-mercapoetanol, DTT e ureia. Os extractos foram aplicados num novo gel e a posição da banda electroforética permaneceu inalterada.



**Figura 9.8 :** Variação das áreas das bandas electroforéticas ao longo do tempo de digestão; resultados referentes a farinha cozida.



No que diz respeito aos oligómeros de 45 e 47 kDa, a sua formação aquando o cozimento poderá ser associada à formação de complexos amido-proteína ou proteína-lípido. Segundo Morrison (1978), quando o amido é cozido em água o seu inchamento pode promover a formação de compostos de inclusão de proteínas. Os resultados de FT-IR apresentados no Capítulo 4 mostraram que aquando da extracção das prolaminas da farinha cozida é também extraído algum amido. Este amido poderá ser amilose que se solubiliza aquando da gelatinização e que passa a ser extractável. No entanto, não se pode descartar a possibilidade desta fracção, que se *mobiliza*, passar formar complexos na superfície do corpo proteico e a actuar como barreira à pepsina.

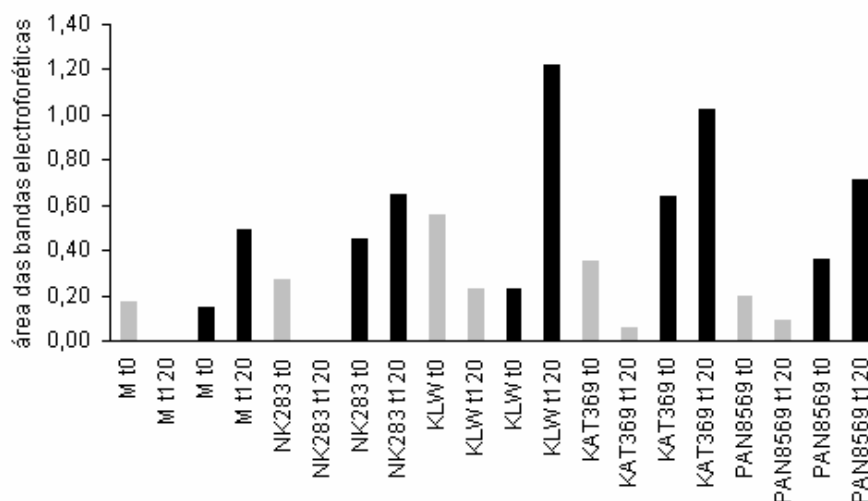
Interacções entre proteína e lípidos foram já referidas por Abd El-Motaal (1998) para produtos à base de soja.

### 9.3.3 Indicadores da digestibilidade

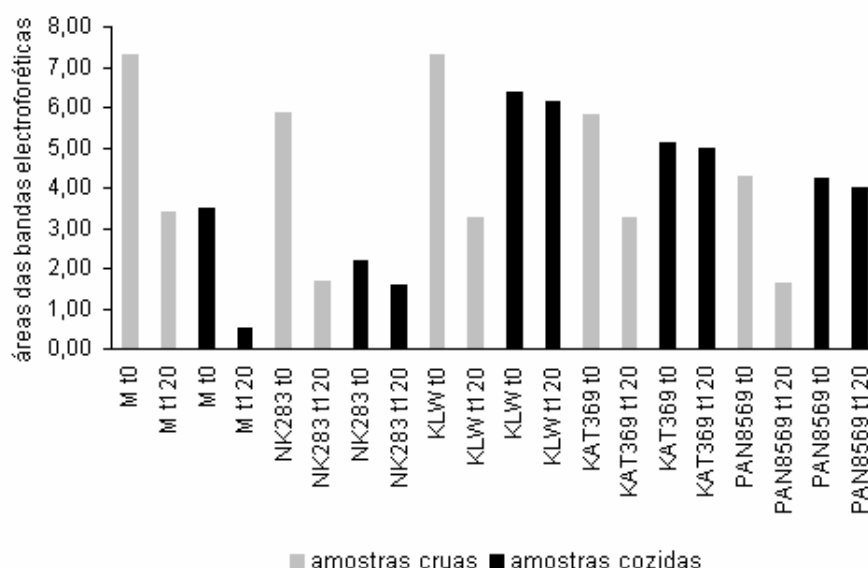
Uma vez que as proteínas de 45 e 47 kDa, assim como o maior teor em monómeros  $\gamma$  e  $\alpha$ , está relacionada com uma menor digestibilidade proteica tentou estabelecer-se uma correlação entre as áreas das bandas electroforéticas e o valor de digestibilidade proteica.

Assim sendo, as áreas das bandas electroforéticas dos monómeros  $\gamma + \alpha$  e dos oligómeros foram determinadas a partir dos perfis electroforéticos correspondentes às proteínas que permaneceram no resíduo após 0 e 120 minutos de digestão. Os resultados correspondentes às amostras cruas e cozidas foram comparados.

As áreas das bandas das prolaminas  $\gamma$  e  $\alpha$  das amostras cruas apresentem um decréscimo acentuado no decorrer da digestão (comparação entre 0 e 120 minutos de digestão). O referido decréscimo foi de 53,5% para o milho, 71,5% para NK 283, 55,1% para K LW, 43,6% para KAT 369 e de 62,5% para PAN 8569 (Figura 9.9).



**A**



**B**

**Figura 9.9:** Áreas electroforéticas correspondentes **(A)** aos oligómeros de 45 e 47 kDa e **(B)** às prolaminas  $\gamma$  e  $\alpha$  presentes nos trilhos electroforéticos das amostras com 0 e 120 minutos de digestão.

Reflectindo os reduzidos valores de digestibilidade ocasionados pelo cozimento da farinha de sorgo as áreas das bandas electforéticas das prolaminas  $\gamma$  e  $\alpha$ , no sorgo cozido, permanecem quase inalteradas pela acção da pepsina. Foram determinados decréscimos de 3,6%, 2,5% e 5,9% respectivamente para K LW, KAT 369 e PAN 8569. No que diz respeito à variedade de sorgo mais digerível, foi detectado um decréscimo de 29,1% (Figura 9.9 B).

As proteínas de 45 e 47 kDa nas fracções de amostras cruas com 0 minutos de digestão é menor do que nas cozidas e desaparecem, quase totalmente, ao longo da digestão.

Nas amostras cozidas a presença dessas proteínas vai tornando-se mais evidente com o decorrer da digestão. Na Figura 9.9 A são apresentadas as áreas referentes às bandas electroforéticas dessas proteínas nos extractos de 0 e 120 minutos. Pode verificar-se que as variedades K LW (0,23-1,22), KAT 369 (0,64-1,02) e PAN 8569 (0,36-0,71) são as que apresentam valores mais elevados. Estes valores estão correlacionados com a redução da digestibilidade com o cozimento.

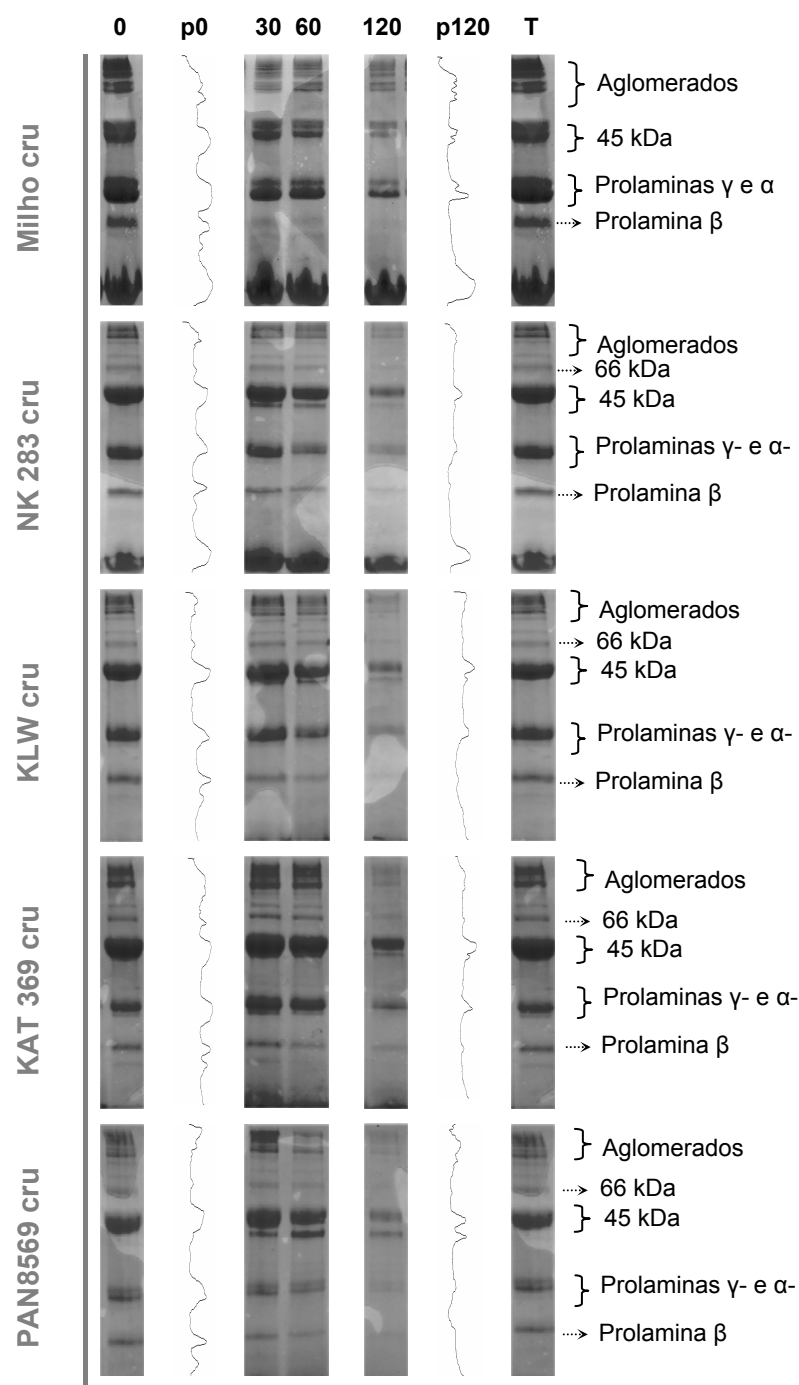
### 9.3.4 Digestão sequencial - extracção com t-butanol

Mesmo sabendo que a extracção com t-butanol pode não ser representativa de toda a amostra, esta extracção foi realizada e o extracto obtido foi analisado por SDS-PAGE. Este extracto, inicialmente analisado na forma não reduzida, permite estudar a digestão proteica a nível dos oligómeros.

#### 9.3.4.1 Amostras de farinha crua

Como foi referido anteriormente, os extractos proteicos obtidos com t-butanol (prolaminas) são caracterizados pela presença de aglomerados de elevado peso molecular, oligómeros de 66 (apenas nas variedades de sorgo) e 45 kDa, assim como monómeros  $\gamma$ ,  $\alpha$  e  $\beta$ .

Como se pode observar na Figura 9.10 a digestão do milho parece ser um pouco distinta da digestão das variedades de sorgo. Por um lado, a velocidade de digestão no milho parece ser mais elevada durante os primeiros 30 minutos do que no restante tempo de digestão. Nas variedades de sorgo a digestão parece ser mais rápida nos últimos 60 minutos de digestão.



**Figura 9.10:** Electroforegramas correspondentes à digestão sequencial de farinha de milho e de sorgo cruas (extracção com t-butanol). Junto aos trilhos electroforéticos das amostras com 0 e 120 minutos são apresentados os respectivos perfis electroforéticos (p0 e p120, respectivamente).

Observando o trilho electroforético correspondente a 120 minutos de digestão do milho e o respectivo perfil electroforético, pode verificar-se que os aglomerados de elevado peso molecular mantêm-se até ao final da digestão,

embora que com menor intensidade. Verifica-se uma diminuição significativa da banda a 45 kDa. Com essa diminuição de intensidade, pode verificar-se que nessa região do gel existem duas proteínas: uma com 45 e uma outra com 47 kDa.

Em relação à digestão dos monómeros do milho, pode verificar-se que a zeínas  $\beta$  e  $\gamma$  parecem ser digeridas preferencialmente.

Este resultado comprova que estas proteínas podem, de facto, estar localizadas na periferia do corpo proteico estando, portanto, mais acessíveis ao ataque da pepsina. Não há vestígios da zeína  $\beta$  no final da digestão.

No que diz respeito aos resultados referentes ao sorgo, no final da digestão as bandas correspondentes aos aglomerados de elevado peso molecular estão presentes em menor intensidade que no milho. Para as quatro variedades de sorgo estudadas os aglomerados de elevado peso molecular e os monómeros parecem ser os mais atacados pela pepsina. Com excepção da variedade KAT369 os monómeros no final da digestão parecem estar apenas presentes em quantidades vestigiais.

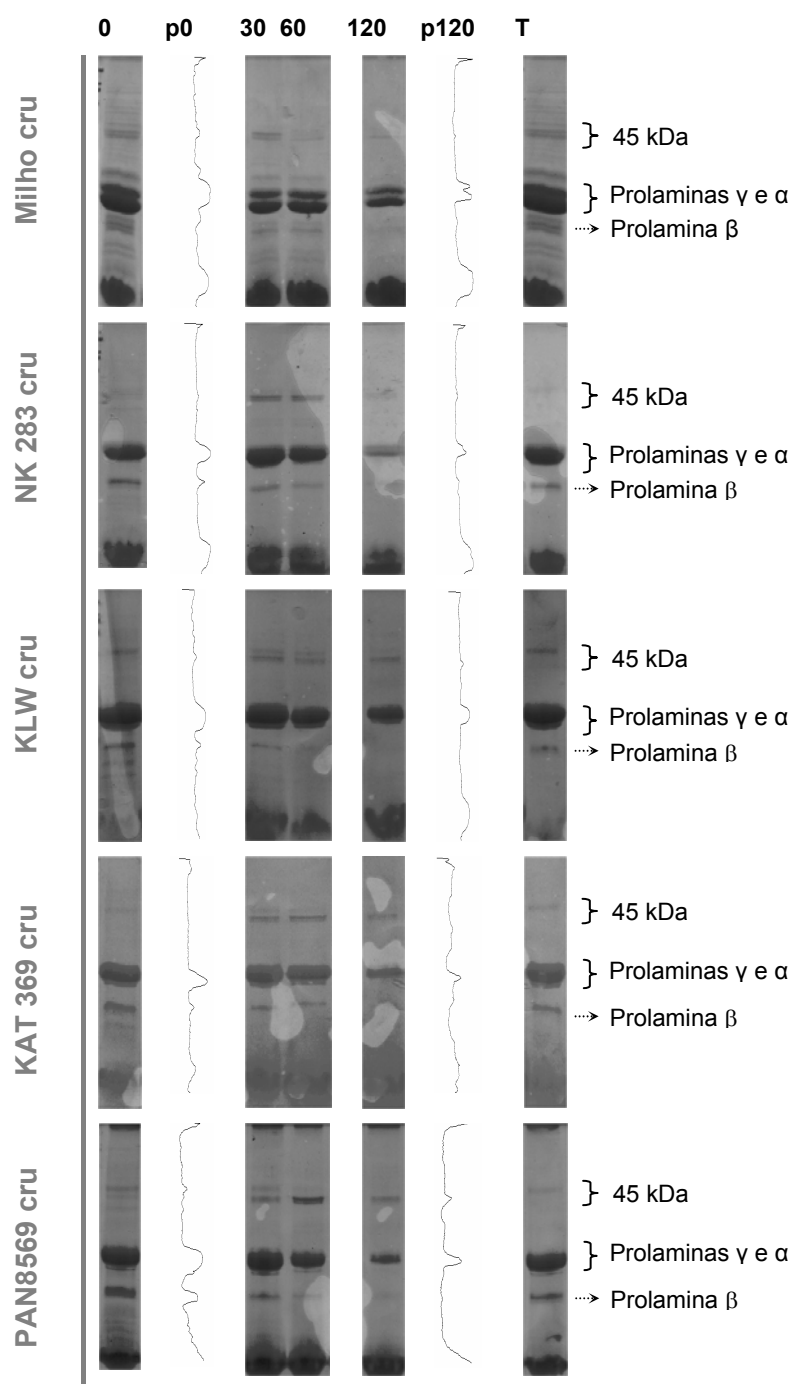
Nas variedades de sorgo não se nota uma digestão mais acentuada do monómeros  $\gamma$ . Isto pode ser devido ao facto deste monómeros no sorgo apresentar peso molecular muito próximo ao monómero  $\alpha$  e, consequentemente, a sua resolução no gel não ser tão evidente como no milho. A kafirina  $\beta$  é digerida mais lentamente do que no milho. Mas, tal como no milho, está ausente no final da digestão.

A proteína de 45 kDa, para além de ser a mais abundante no início, parece ser a mais resistente à digestão. Tal como ocorre no milho, quando a concentração da proteína de 45 kDa diminui com a digestão verificou-se ser constituída por duas bandas electroforéticas uma com 47 kDa e outra com 45 kDa.

Os extractos proteicos foram, também, analisados por SDS-PAGE na presença de 2-mercaptoetanol. Nestas condições as ligações S-S, tanto dos aglomerados como dos oligómeros, sofrem clivagem e no gel aparecem apenas os monómeros.

Os resultados são apresentados na Figura 9.11. Tanto no milho como nas variedades de sorgo, a redução não foi completa. Na região de 45 kDa

pode verificar-se a presença de uma proteína. Como referido anteriormente nesta região surgem duas proteínas uma com 47 e outra com 45 kDa, sendo a primeira significativamente mais abundante que a segunda.



**Figura 9.11:** Electroforegramas correspondentes à digestão sequencial de farinha de milho e de sorgo cruas (amostras extraídas com t-butanol e reduzidas). Junto aos trilhos electroforéticos das amostras com 0 e 120 minutos são apresentados os respectivos perfis electroforéticos (p0 e p120, respectivamente).

Uma análise mais aprofundada (determinação de peso molecular exacto recorrendo a valores de  $R_f$ ) revelou que a proteína mais resistente à digestão é a de 45 kDa. Com excepção da variedade NK283, esta proteína está presente em quantidade superior no sorgo, tanto no início como no fim da digestão. A variedade NK283 comporta-se de forma similar ao milho: no final da digestão são detectados os monómeros  $\gamma$  e  $\alpha$ , assim como quantidades vestigiais de  $\beta$ .

No final da digestão das variedades K LW, KAT369 e PAN8569 pode detectar-se no gel correspondente às proteínas não digeridas pela pepsina, uma banda electroforética a 45 kDa e outras correspondentes aos monómeros  $\gamma$  e  $\alpha$ .

No milho, os monómeros mais rapidamente digeridos pela pepsina são os  $\gamma$  e  $\beta$ , confirmando-se mais uma vez a maior acessibilidade. Esta característica, mais uma vez, não foi encontrada na digestão do sorgo.

### Amostras de farinha cozida

Como foi referido anteriormente as amostras cozidas não se deixam extrair facilmente com t-butanol, mesmo após uma hora de extracção, os extractos não são representativos

## 9.4 Conclusões

A digestão sequencial das amostras de farinha cruas revelou que tanto o milho como o sorgo se comportam de forma similar. Quando a farinha cozida é submetida a digestão sequencial começam a ser evidenciadas algumas diferenças.

O tipo e quantidade de proteína que subsiste após 120 minutos de digestão parece estar relacionada com os valores de digestibilidade. Quanto menos digerível é a farinha maior é a quantidade de monómeros  $\gamma$  e  $\alpha$  e, principalmente, mais oligómeros de 45 kDa e 47 kDa são detectados no

resíduo não digerido. A presença destas quatro proteínas poderá ser útil para monitorizar a digestibilidade proteica das amostras.

O oligómero de 47 kDa, nunca foi referido anteriormente, e está presente apenas nas amostras cozidas referentes às variedades com valores de digestibilidade inferiores (KLW, KAT 369 e PAN 8569).

## 9.5 Bibliografia

Aboubacar, A.; Axtell, J.D.; Huang, C.-P. e Hamaker, B.R. (2001) A rapid protein digestibility assay for identifying highly digestible sorghum lines, *Cereal Chem.*, **78**(2): 160-165.

Axtell, J.D.; Kirleis, A.W.; Hassen, M.M.; Mason, N.d'C., Mertz, E.T. e Munck, L. (1981) Digestibility of sorghum proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **78**(3): 1333-1335.

Barros A. (1999) Contribution à la sélection et la comparaison de variables caractéristiques. Tese de Doutoramento, Institut Nationale Recherche Agronomique: Paris, France.

Correia, A.I. (2003) Efeito do processo fermentativo em farinhas de sorgo. Tese de Mestrado, Departamento, Coimbra, Portugal

Duodu, K.G.; Nunes, A.; Delgadillo, I; Parker, M.L.; Mills, E.N.C.; Belton, P.S. e Taylor, J.R.N. (2002) Effect of grain structure and cooking on sorghum and maize in vitro protein digestibility *J. Cereal Sci.*, **35**: 161-174.

Hamaker, B.R.; Mertz, E.T. e Axtell, J.D. (1994) Effect of extrusion on sorghum kafirin solubility, *Cereal Chem.*, **71**: 515-517.

Hamaker, B.R.; Kirleis, A.W.; Butler, L.G.; Axtell, J.D. e Mertz, E.T. (1987) Improving the in vitro protein digestibility of sorghum with reducing agents, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **84**, 626-628.

Hamaker, B.R.; Kirleis, A.W.; Mertz, E.T. e Axtell, J.D. (1986) Effect of cooking on protein profiles and in vitro digestibility of sorghum and maize, *J. Agric. Food Chem.*, **34**, 647-649.

Nunes, A.; Correia, I.; Barros A. e Delgadillo, I. (2004) Sequential *in vitro* pepsin digestion of uncooked and cooked sorghum and maize samples. *J. Agric. and Food Chem.*, **52**, 2052-2058.



- Oria, M.P.; Hamaker, B.R. e Shull, J.M. (1995) Resistance of sorghum alfa-, beta- and gamma- kafirins to pepsin digestion, *J. Agric. Food Chem.*, **43**, 2148-2153.
- Oria, M.P.; Hamaker, B.R.; Axtell, J.D. e Huang, C.-P. (2000) A highly digestible sorghum mutant cultivar exhibits a unique folded structure of endosperm protein bodies, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **97**(10): 5065-5070.
- Rom, D.L.; Shull, J.M.; Chandrashekar, A. e Kirleis, A.W. (1992) Effects of cooking and treatment with sodium bisulfite on in vitro protein digestibility and microstructure of sorghum flour, *Cereal Chem.*, **69**(2): 178-181.
- Shewry, P.R.; Tathan, A.S. e Fido, R.J. (1995) Separation of plant Proteins by Electrophoresis *in* Plant Gene Transfer and Expression Protocols (H. Jones Ed.) Humana Press: Totowa, New Jersey.
- Shull, J.M.; Watterson, J.J. e Kirleis, A.W. (1991) Proposed nomenclature for alcohol-soluble proteins (kafirins) of *Sorghum bicolor* (L.) Moench based on molecular weight, solubility and structure, *J. Agric. Food Chem.*, **39**, 83-87.
- Shull, J.M.; Watterson, J.J. e Kirleis, A.W. (1991) Purification and immunocytochemical localization of kafirins in *Sorghum bicolor* (L.) Moench endosperm, *Protoplasma*, **171**, 64-74.
- Taha, F. S. e Mohamed, S. S. (2004) Effect of different denaturing methods on lipid protein complex formation. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* **37**, 99-104.
- Weaver, C.A.; Hamaker, B.R. e Axtell, J.D. (1998) Discovery of grain sorghum germ plasm with high uncooked and cooked in vitro protein digestibilities, *Cereal Chem.*, **75**(15): 665-670.



# Efeito de compostos fenólicos e lípidos na digestão

## 10.1 Introdução

Os compostos não proteicos existentes na farinha de sorgo que parecem influenciar os valores de digestibilidade proteica são, sem dúvida, os compostos fenólicos e os lípidos. Em relação à primeira família de compostos, existem numerosas referências bibliográficas acerca do efeito das proantocianidinas (taninos condensados) na digestibilidade proteica do sorgo, embora alguns estudos pareçam estar em contradição.

Alguns mostram que a presença de taninos reduz a digestibilidade das amostras (Tamir e Alumot, 1969; Armstrong *et al.* 1974; Eggum e Chistensen, 1975; Marquardt *et al.* 1976; Chavan *et al.* 1979; Price *et al.* 1979; Reichert *et al.* 1980; Babiker e El Tinay 1992; Elkin *et al.* 1996), enquanto que outros encontraram que a sua presença influencia positivamente a digestibilidade proteica (Agudelo *et al.* 1997). Não se conhece o efeito de outros compostos fenólicos de natureza não tanínica nos valores de digestibilidade das proteínas de sorgo.

No que diz respeito aos lípidos, não há muitos estudos acerca da sua influência nos valores de digestibilidade, no entanto o estudo da sua acção na digestibilidade de sorgo parece ser importante uma vez que estes compostos são marcadamente afectados como o cozimento (Capítulo 4).

Para o estudo do papel desempenhado por estes compostos na digestibilidade, tanto os compostos fenólicos como os lípidos foram removidos das farinhas de sorgo, as farinhas foram posteriormente cozidas e a sua digestibilidade determinada.

### 10.1.1 Efeito dos compostos fenólicos na digestão

O efeito biológico dos taninos traduz-se na sua capacidade de estabelecerem ligações com proteínas, coagulando-as ou precipitando-as, tornando-as inacessíveis ao ataque enzimático (Butler *et al.* 1984).

Os grãos de sorgo com elevadas quantidades de taninos são resistente ao ataque de pássaros (Burns, 1971; Tipton *et al.* 1970), insectos e fungos (Harris e Burns, 1973). Estas variedades são também menos susceptíveis à germinação pré-colheita (Harris e Burns, 1973). Essas variedades de sorgo tornam-se importantes em certas regiões onde o efeito depredatório dos pássaros é relevante (Bullard *et al.* 1980).

No entanto, desde alguns anos, a diminuição da qualidade nutricional do grão tem vindo a ser associada à presença destes compostos (Price *et al.* 1979). Os taninos combinam-se com proteínas exógenas e endógenas, nomeadamente com as enzimas do tracto digestivo, afectando assim a actividade enzimática (Eggum e Chistensen, 1975).

Em estudos realizados *in vitro*, com pepsina, verificou-se que a digestibilidade proteica de duas espécies de sorgo ricas em taninos era significativamente inferior a de um híbrido sem taninos, com valores de 26,0%, 29,4% e 61,9% respectivamente (Agudelo *et al.* 1997). Resultados semelhantes já haviam sido encontrados por Babiker e El Tinay (1992). Quando os taninos são removidos do sorgo observa-se um aumento dos valores de digestibilidade proteica *in vitro* (Tamir e Alumot, 1969; Chavan *et al.* 1979).

Estudos *in vivo* efectuados em ratos (Marquardt *et al.* 1976; Reichert *et al.* 1980) e em galinhas (Armstrong *et al.* 1974), mostraram que a extracção de taninos promoveu ganhos de peso e de conversão alimentar.

Por todas essas evidências, têm sido desenvolvidos vigorosos esforços no sentido de se tentar conciliar os efeitos benéficos dos taninos nas culturas de sorgo, com métodos que permitam superar os seus efeitos anti-nutricionais nas sementes. Dentre estes métodos, sabe-se que o cozimento dos grãos em água ou meio alcalino aumenta a qualidade nutricional do grão (Price *et al.* 1980; Babiker e El Tinay, 1991). A remoção do pericarpo e testa

(Price e Butler, 1978; Chibber *et al.* 1980), a germinação e a fermentação (Chavan *et al.* 1981), o tratamento químico (Price e Butler, 1978; Chavan *et al.* 1979; Babiker e El Tinay, 1991) e o armazenamento do grão humidificado (Mitaru *et al.* 1983) também contribuem para a redução do teor em taninos do grão.

Em 1996, Elkin *et al.* estudaram variedades de sorgo com conteúdos similares em taninos e verificaram que a digestibilidade proteica, em galinhas, variava. Verificaram ainda que, com determinadas variedades de sorgo sem taninos, a digestibilidade era menor. Estes autores concluíram então, que devem haver outros factores, que não só os taninos, responsáveis pela diminuição da digestibilidade das proteínas.

Siebert *et al.* (1996) num estudo de sistemas modelo, com compostos fenólicos e gelatina, verificaram que compostos fenólicos de natureza não proantocianidínica incrementavam a solubilidade de proteínas.

Emmambux *et al.* (2003) verificaram que compostos fenólicos não tanínicos não promovem precipitação de kafirinas enquanto que os taninos apresentam essa capacidade.

Quando os compostos fenólicos foram removidos das kafirinas estas perderam, de forma irreversível, a sua solubilidade (Nunes 2000).

Ao longo deste trabalho foram estudadas variedades de sorgo sem taninos condensados (proantocianidinas). Com estas variedades é possível o estudo do efeito dos restantes compostos fenólicos do grão de sorgo na digestibilidade proteica.

### 10.1.2 Efeito dos lípidos na digestão

Não existem estudos prévios que nos indiquem qual a influência dos lípidos na digestibilidade proteica do sorgo. No entanto, julgou-se importante o estudo da sua influência na digestibilidade proteica uma vez que, como foi mostrado no Capítulo 5, a fracção lipídica de sorgo sofre alterações com o cozimento que se traduzem em alterações drásticas da sua mobilidade (explicação detalhada no Capítulo 7).

Alguns estudos indicam a capacidade da fracção lipídica de sorgo estabelecer complexos, quer com proteína quer com amido. De acordo com Englyst *et al.* (1983), o cozimento pode promover a formação de complexos (físicos ou químicos) entre o amido e lípidos ou proteínas. Esses complexos, resistentes ao ataque de enzimas amilolíticas, poderão dificultar o acesso das enzimas digestivas às proteínas. Morrison, em 1978, tinha referido a capacidade de formação de complexos de inclusão entre amido e lípidos.

Interacções entre proteína e lípidos foram referidas para produtos à base de soja (Abd El-Motaal 1998), foi sugerido que estas interacções seriam responsáveis por redução da digestibilidade proteica (Taha e Mohamed, 2004).

Zhang *et al.* (2004) sugeriram que quando se aquecem e em seguida se arrefecem misturas com amido de sorgo, ácidos gordos e proteína de soro de leite, ocorre a formação de complexos de inclusão (ácido gordo em amilose) sob a forma de complexos ordenados de tipo V. Nestas misturas, as proteínas têm o papel de restringir os movimentos aleatórios das moléculas de amilose e ácido gordo, induzindo a formação do referido complexo de inclusão.

## 10.2 Metodologia

- 1º Remoção dos compostos fenólicos / lípidos das amostras de farinha.
- 2º Preparação das amostras de farinha cozida, a partir das amostras sem compostos fenólicos ou sem lípidos.
- 3º Determinação da eficiência da extracção.
- 4º Ensaio da digestibilidade *in vitro*.
- 5º Cálculo da digestibilidade proteica da farinha sem compostos fenólicos /lípidos crua e cozida.
- 6º Ensaio da digestibilidade sequencial *in vitro*, para ambos os casos.
- 7º Extracção das proteínas não digeridas.
- 8º Estudo das proteínas não digeridas por SDS-PAGE.

### 10.2.1 Preparação das amostras

Para a remoção dos compostos fenólicos, 250 mg de farinha foram extraídas com 1 mL de metanol ácido (1% de HCl), e após 30 minutos de extracção, a mistura foi centrifugada. O procedimento foi repetido mais duas vezes (Price *et al.* 1979).

Aquando da extracção dos compostos fenólicos houve necessidade de neutralizar o sistema com NaOH 2 M antes das farinhas serem submetidas a cozimento.

De forma à remoção dos lípidos, 300 mg de farinha foram extraídas com 1 mL de clorofórmio, e após 30 minutos de extracção, a mistura foi filtrada. O procedimento foi repetido mais duas vezes.

Após extracção as farinhas foram secas, inicialmente ao ar e depois em estufa de vazio, de forma a remover os solventes utilizados na extracção.

Para preparação das amostras cozidas quando as amostras de farinha se encontraram secas foram misturadas com água (1:10) e fervidas durante 20 minutos.

### 10.2.2 Estudo da eficiência de extracção

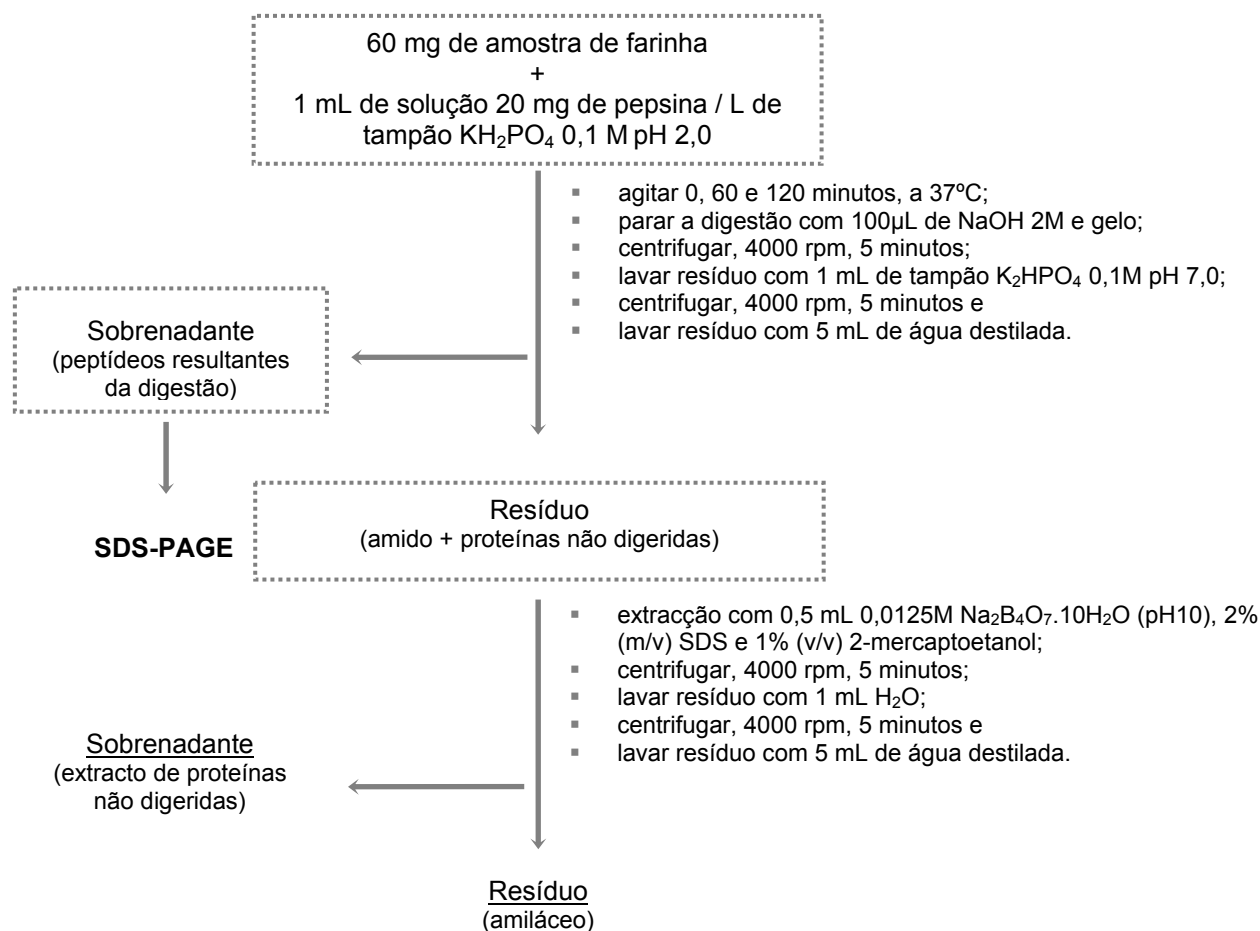
A eficiência das extracções foi avaliada recorrendo a técnicas espectroscópicas. O FT-IR foi usado para estudar a eficiência da extracção dos lípidos e dos taninos. O RMN  $^{13}\text{C}$  (SPE) foi utilizado para estudar a eficiência de extracção dos lípidos.

Os espectros das farinhas com e sem lípidos e sem compostos fenólicos foram adquiridos na gama de 4000 a 500  $\text{cm}^{-1}$  (na gama de infravermelho médio) com resolução de 8  $\text{cm}^{-1}$  num espectrómetro Bruker IFS 55 com acessório Golden Gate (sistema de ATR de reflexão única), com acumulação de 256 scans. Foram realizadas cinco réplicas de cada amostra. Os espectros de FT-IR foram submetidos a uma análise exploratória – análise em componentes principais (PCA), utilizando um programa desenvolvido por Barros (1999).

As experiências de SPE  $^{13}\text{C}$  foram adquiridas num espectrómetro Bruker AVANCE 400 (DRX) operando a 400 MHz para a frequência do protão, com uma sonda de 7 mm e com as seguintes condições de aquisição: rotação da amostra de 4,5 kHz, pulso de  $90^\circ$  de 4 ms, contacto de 1 ms, intervalo entre aquisições de 3 s.

### 10.2.3 Digestão sequencial

A digestão sequencial foi realizada seguindo o procedimento adaptado de Weaver *et al.* (1998) e de Aboubacar *et al.* (2001), descrito anteriormente. Para tal, a reacção com pepsina foi interrompida por diminuição de pH (adição de NaOH) e diminuição de temperatura após: 0, 60 e 120 minutos.



**Figura 10.1:** Fluxograma do procedimento referente à digestão sequencial *in vitro* e extracção das proteínas não digeridas.



Os resíduos obtidos foram submetidos a uma extracção de proteína total de modo permitir o estudo das proteínas não digeridas. A referida extracção efectuou-se com uma solução de 0,0125M  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  (pH10), 2% (m/v) SDS e 1% (v/v) 2-mercaptoetanol sob agitação magnética durante uma hora (Wallace *et al.* 1990).

Após centrifugação (centrífuga Kubota 2010) a 4000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante, contendo as proteínas não digeridas, foi separado do resíduo amiláceo.

O extracto proteico foi analisado por SDS-PAGE (Figura 10.1).

#### 10.2.4 Análise dos extractos proteicos por SDS-PAGE

Os extractos proteicos foram analisados por SDS-PAGE. A separação electroforética foi efectuada num sistema Mini Protean II (BioRad) em gel de poliacrilamida na presença de dodecil-sulfato de sódio como agente dissociante (Shewry *et al.* 1995). Ensaio preliminares revelaram que a composição ideal do gel seria: 15% de acrilamida e 0,4% de bis-acrilamida em Tris/HCl 1,5 M, pH 8,8, na presença de SDS 0,1% (m/v). O gel concentrador era constituído por 4% de acrilamida e 0,4% de bis-acrilamida em Tris/HCl 0,5 M, pH 6,8 na presença de SDS 0,1% (m/v). A polimerização dos géis foi iniciada com N,N,N',N'- tetrametiletilenodiamina (TEMED) 42,5 mM e catalisada por persulfato de amónio (APS) 0,05% (m/v).

A 10  $\mu\text{L}$  de amostra foi adicionado igual volume de solução desnaturante constituída por Tris 62,5 mM, SDS 2% (m/v), glicerol 10% (v/v), azul de bromofenol 0,01% (m/v) e 2-mercaptoetanol 5% (v/v). A mistura foi fervida 5 minutos para promover a desnaturação das proteínas e em seguida foram aplicados 7  $\mu\text{L}$  no gel. A separação electroforética decorreu durante 45 minutos a 150 V (fonte BioRad Power-Pac 300) em solução de Tris 25 mM, glicina 0,192 M, pH 8,3 e SDS 0,1%.

Os perfis electroforeticos foram obtidos de acordo com o descrito no Capítulo 5.

### 10.2.5 Determinação valores digestibilidade

Para determinação dos valores de digestibilidade procedeu-se a um outro ensaio de digestibilidade em paralelo. Neste ensaio, após a digestão com pepsina, não se procedeu à extracção das proteínas não digeridas. Os resíduos digeridos foram liofilizados e submetidos a determinação do azoto total por análise elementar.

Para o ensaio em branco ( $t_0$ ) adicionou-se, simultaneamente, pepsina e NaOH, não chegando, portanto, a haver digestão.

Para a conversão do azoto total em proteína bruta não digerida, utilizou-se o factor de convencional para cereais de 6,25 (Norma Portuguesa nº 1996).

### 10.2.6 Cálculo dos valores de digestibilidade

A percentagem de digestibilidade foi então calculada através da fórmula:

$$\frac{[N_0] - [N_{120}]}{[N_0]} \times 100$$

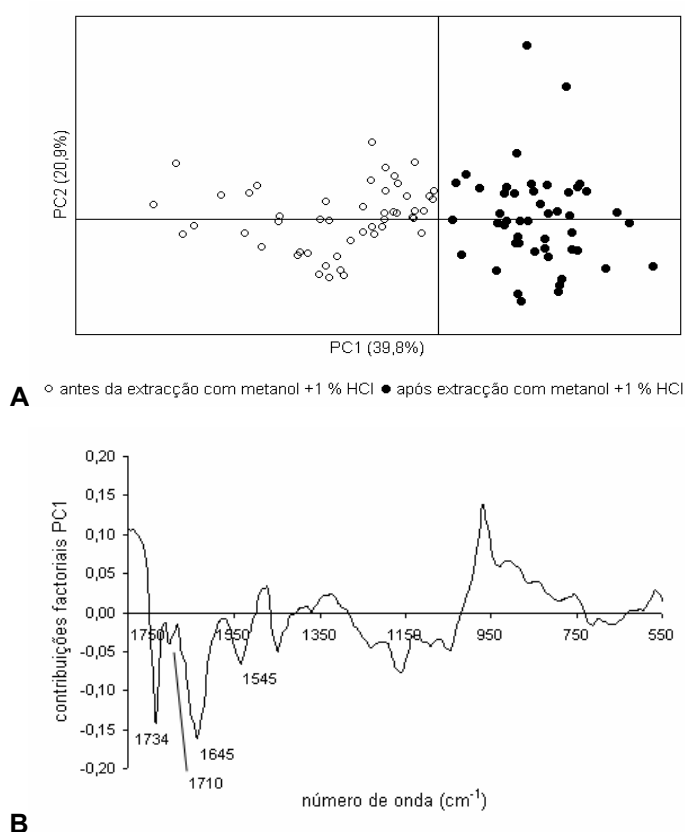
em que  $N_0$  é o teor de azoto na amostra sem digestão e  $N_{120}$  o teor em azoto da amostra com 120 minutos de digestão com pepsina.

## 10.3 Resultados e discussão

### 10.3.1 Efeito dos compostos fenólicos

#### 10.3.1.1 Eficiência de extracção dos compostos fenólicos

A eficiência da extracção com metanol acídico foi avaliada recorrendo à análise de espectros de FT-IR das farinha antes e após da referida extracção.



**Figura 10.2:** (A) Diagrama de coordenadas factoriais de PC1 vs PC2 e (B) diagrama das contribuições factoriais do PC1 referentes aos espectros de FT-IR das amostras de farinha antes e após a extracção com metanol ácido. Espectros analisados na sub-região 1800-550  $\text{cm}^{-1}$ .

Após aquisição dos espectros de FT-IR os espectros da farinha com e sem tratamento foram submetidas a análise em componentes principais, os resultados estão apresentados na Figura 10.2.

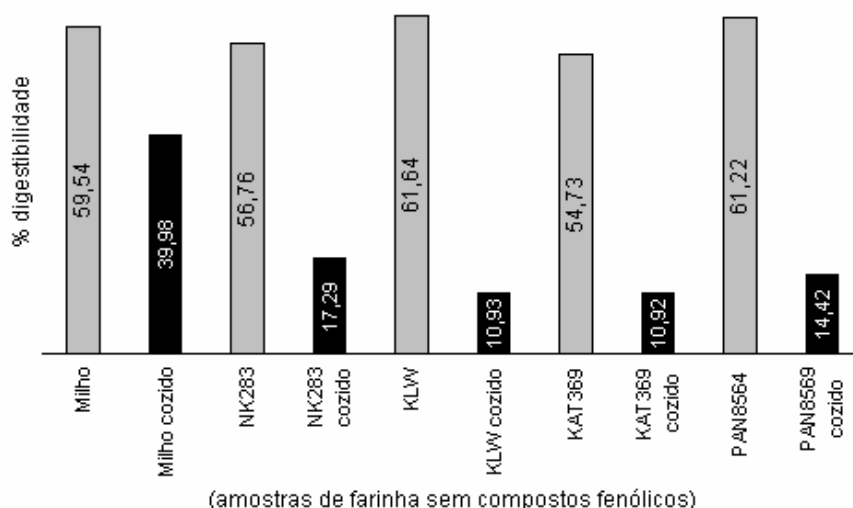
De acordo com o diagrama de coordenadas factoriais PC1 vs PC2 a extracção com metanol ácido possibilitou a discriminação de dois grupos de amostras através do eixo PC1, responsável pela explicação de 39,8% da informação (Figura 10.2 A). De acordo com o diagrama de contribuições factoriais (Figura 10.2 B) a discriminação através do referido eixo é devida principalmente a sinais localizados a 1734  $\text{cm}^{-1}$  (C=O vicinais – compostos fenólicos), 1710  $\text{cm}^{-1}$  (C=O ácidos gordos ou compostos fenólicos), 1650 e 1545  $\text{cm}^{-1}$  (Amida I e II de proteína). Estes sinais estão correlacionados positivamente com as amostras localizadas na região negativa do PC1 – farinha sem extracção. Para além da extracção com metanol e 1% de HCl ser

uma extracção amplamente utilizada na extracção de compostos fenólicos de cereais a informação contida nos espectros de FT-IR permite-nos concluir que aquando da extracção são extraídos maioritariamente compostos fenólicos e, minoritariamente, são extraídos alguns lípidos (ácidos gordos) juntamente com alguma proteína.

### 10.3.1.2 Efeito dos compostos fenólicos nos valores de digestibilidade

A definição da digestibilidade definida no Capítulo 8 vai servir para o cálculo dos valores de digestibilidade referentes às farinhas submetidas a extracção prévia dos taninos. A digestibilidade também foi calculada para a farinha cozida após extracção.

Os valores de digestibilidade proteica de amostras cruas de farinha de milho e de sorgo sem compostos fenólicos é de 59,54% para o milho, 56,76% para a variedade de sorgo NK283, 61,64% para a variedade KLV, 54,73% para a variedade KAT369 e de 61,22% para variedade PAN8569 (Figura 10.3).



**Figura 10.3:** Percentagem da digestibilidade de amostras de farinha de milho e sorgo às quais foram removidos os compostos fenólicos e após serem submetidas a cozimento. Valores determinados a partir do teor em azoto em amostras digeridas (t120) e em amostras não digeridas (t0).

De uma forma global, a remoção de compostos fenólicos com a solução extractora usual (metanol + HCl 1%) promove redução da digestibilidade das amostras cruas. No milho a redução da digestibilidade entre farinha crua e farinha crua sem compostos fenólicos é de 9,76%. Relativamente às amostras de farinha de sorgo a redução é de 17,30%, 18,36%, 18,06% e 14,62%, respectivamente, para NK283, K LW, KAT369 e PAN8569. Como se pode verificar, a redução da digestibilidade causada por remoção de compostos fenólicos é um pouco mais acentuada para o caso das farinhas de sorgo (Tabela 10.1).

Na Figura 10.2 são também apresentados os valores de digestibilidade das amostras cozidas após remoção de compostos fenólicos. Os valores encontrados foram de 39,98% para o milho, e de 17,29%, 10,93%, 10,92% e 14,42% para as farinhas de sorgo cozidas sem compostos fenólicos, respectivamente, NK283, K LW, KAT369 e PAN8569.

**Tabela 10.1:** Percentagem da digestibilidade de amostras de farinha de milho e sorgo cruas e sem compostos fenólicos. Redução dos valores de digestibilidade com a remoção de compostos fenólicos.

	Digestibilidade (amostras cruas)	Digestibilidade (amostras cruas sem compostos fenólicos)	Redução da digestibilidade com remoção compostos fenólicos
<b>Milho</b>	65,98%	59,54%	9,76%
<b>NK 283</b>	68,63%	56,76%	17,30%
<b>K LW</b>	75,62%	61,74%	18,36%
<b>KAT 369</b>	66,79%	54,73%	18,06%
<b>PAN 8569</b>	71,70%	61,22%	14,62%

Quando se observa a Tabela 10.2 e se comparam valores de digestibilidade de amostras de farinha cozida, com e sem compostos fenólicos pode verificar-se que a redução dos valores de digestibilidade proteica é mais acentuada na ausência de compostos de natureza tanínica.

Essa redução é tanto maior quanto maior o valor da digestibilidade da farinha cozida (Tabela 10.2).

**Tabela 10.2:** Percentagem da digestibilidade de amostras de farinha de milho e sorgo cozidas com e sem compostos fenólicos. Redução dos valores de digestibilidade ocasionadas pela remoção de compostos fenólicos.

	Digestibilidade (amostras cozidas)	Digestibilidade (amostras cozidas sem compostos fenólicos)	Redução da digestibilidade com a remoção compostos fenólicos
<b>Milho</b>	64,46%	39,98%	37,98%
<b>NK 283</b>	32,71%	17,29%	47,14%
<b>KLW</b>	19,04%	10,93%	42,59%
<b>KAT 369</b>	14,52%	10,92%	24,79%
<b>PAN 8569</b>	24,91%	14,42%	42,11%

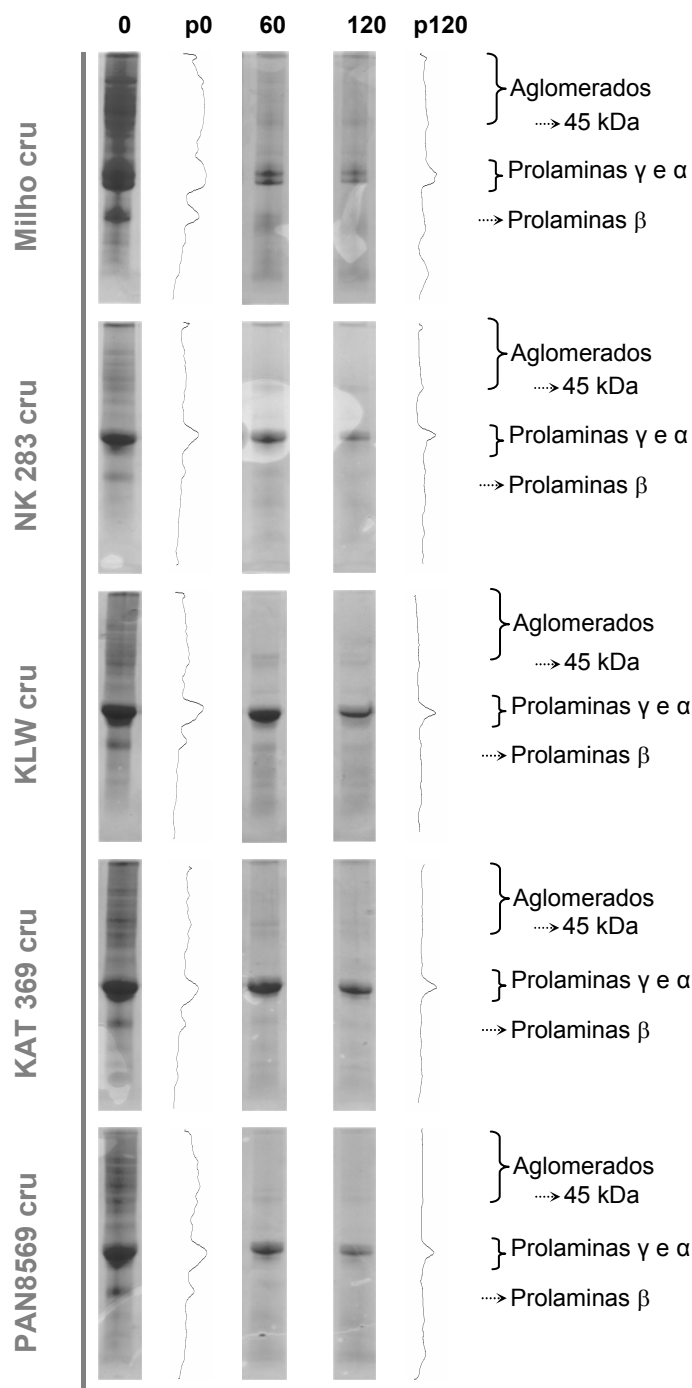
Quando os compostos fenólicos são removidos do sistema e a farinha é, de seguida cozida, os valores de digestibilidade não aumentam, como seria de esperar se esses compostos estivessem associados à redução da digestibilidade do sorgo.

Estes resultados confirmam os de Aguelo *et al.* (1997): a presença de compostos fenólicos não é uma das causas da reduzida digestibilidade das farinhas de sorgo. O mesmo se verifica no caso da farinha de milho. Quando a farinha de milho é cozida não ocorre diminuição da digestibilidade proteica mas se for cozida na ausência de compostos fenólicos verifica-se redução dos referidos valores.

### 10.3.1.3 Efeito dos compostos fenólicos na digestibilidade sequencial

Na tentativa de compreender o papel dos compostos fenólicos nas farinhas procedeu-se ao estudo da digestibilidade sequencial das farinhas sem compostos fenólicos e após terem sido cozidas.

O perfil electroforético correspondente ao tempo de digestão zero é bastante similar ao correspondente perfil das amostras com compostos fenólicos. Pode detectar-se, para todas as variedades de farinha, a presença de aglomerados de elevado peso molecular e monómeros  $\gamma$ ,  $\alpha$  e  $\beta$ .



**Figura 10.4:** Electroforegramas correspondentes à digestão sequencial de farinha de milho e de sorgo cruas, após remoção de compostos fenólicos. Junto aos trilho electroforéticos das amostras com 0 e 120 minutos são apresentados os respectivos perfis electroforéticos (p0 e p120, respectivamente).

Relativamente ao tempo de digestão de 60 minutos pode salientar-se a presença de oligómero de 45 kDa. A presença deste oligómero foi unicamente detectada em electroforegramas correspondentes a farinha submetida a tratamento térmico e, conseqüentemente, que apresentem valores de digestibilidade reduzidos.

A redução da digestibilidade detectada em amostras de farinha crua sem compostos fenólicos pode traduzir-se na presença desses mesmos oligómeros no final da extracção.

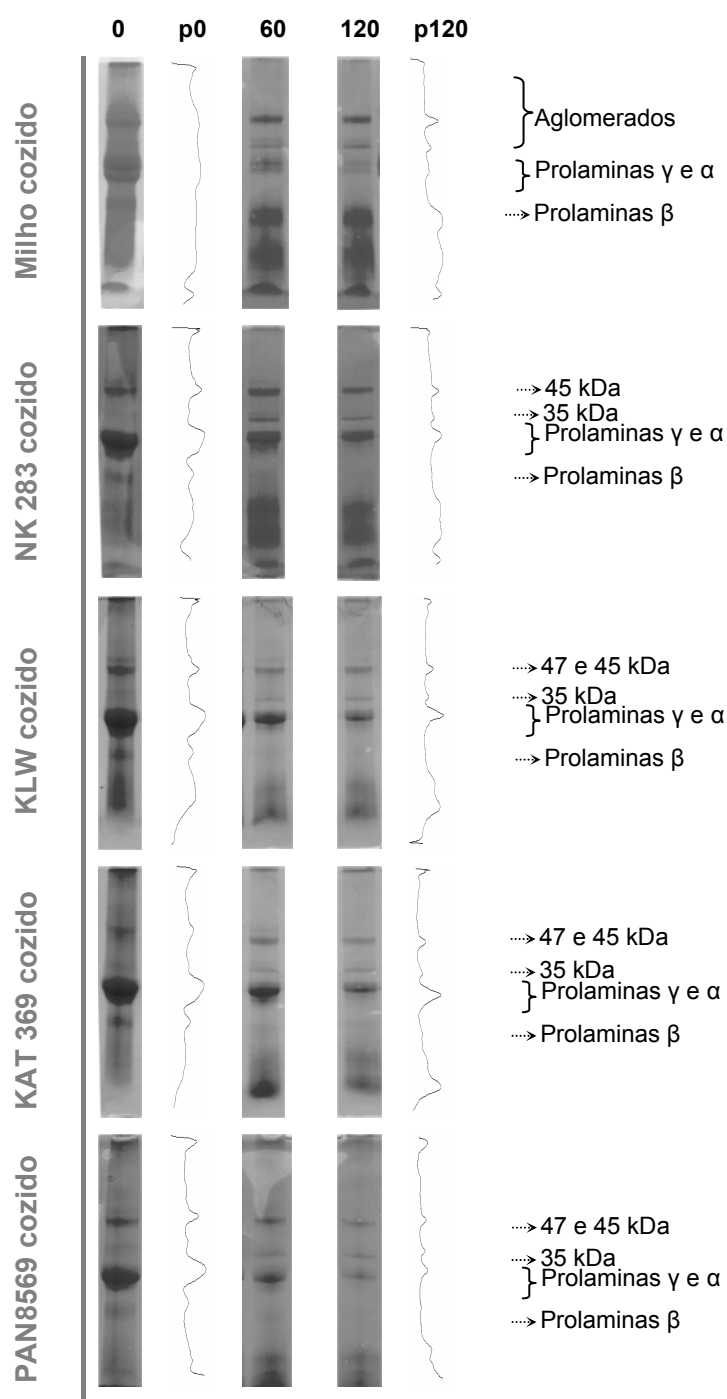
No final da digestão, decorridos 120 minutos, podem ser detectados no electroforegramas e nos perfis de cada uma das farinhas a presença de monómeros  $\gamma$ ,  $\alpha$  e  $\beta$  mas também está presente uma banda ténue a 45 kDa. As bandas correspondentes aos monómeros  $\gamma$  e  $\alpha$  parecem ser mais intensas que no caso das farinhas cruas e no final da digestão, também podem ser detectados traços vestigiais do monómero  $\beta$  (Figura 10.4).

Quando a farinha é cozida após remoção de compostos fenólicos, no início da digestão (0 minutos) é prontamente detectada a presença de bandas electroforéticas correspondentes aos aglomerados. Estas bandas são mais intensas que no caso das amostras cozidas com compostos fenólicos. Por entre esses aglomerados é, à partida, detectada a presença do oligómero de 45 kDa. Esta evidência parece mostrar que os compostos fenólicos evitam a formação de ligações proteína-proteína e que na ausência desses compostos as referidas ligações parecem ser favorecidas (Figura 10.5).

Após 60 minutos de digestão podem ser detectadas as presenças de um oligómero a 45 kDa e ainda de um outro localizado entre a banda electroforética dos 45 kDa e as bandas electroforéticas dos monómeros  $\gamma$  e  $\alpha$  - 35 kDa.

Decorridos 120 minutos de digestão a presença dos oligómeros a 45 e 35 kDa é evidente e, comparando estes perfis com os perfis electroforéticos das amostras cozidas, parecem estar presentes maior quantidade de monómeros  $\gamma$  e  $\alpha$  (Figura 10.5).





**Figura 10.5:** Electroforegramas correspondentes à digestão sequencial de farinha de milho e de sorgo cozidas após remoção de compostos fenólicos. Junto aos trilho electroforéticos das amostras com 0 e 120 minutos são apresentados os respectivos perfis electroforéticos (p0 e p120, respectivamente).

Os resultados obtidos por SDS-PAGE vêm confirmar os resultados dos valores de digestibilidade proteica das amostras sem compostos fenólicos, as

amostras menos afectados com o cozimento parecem ser mais afectadas, pela ausência de compostos fenólicos.

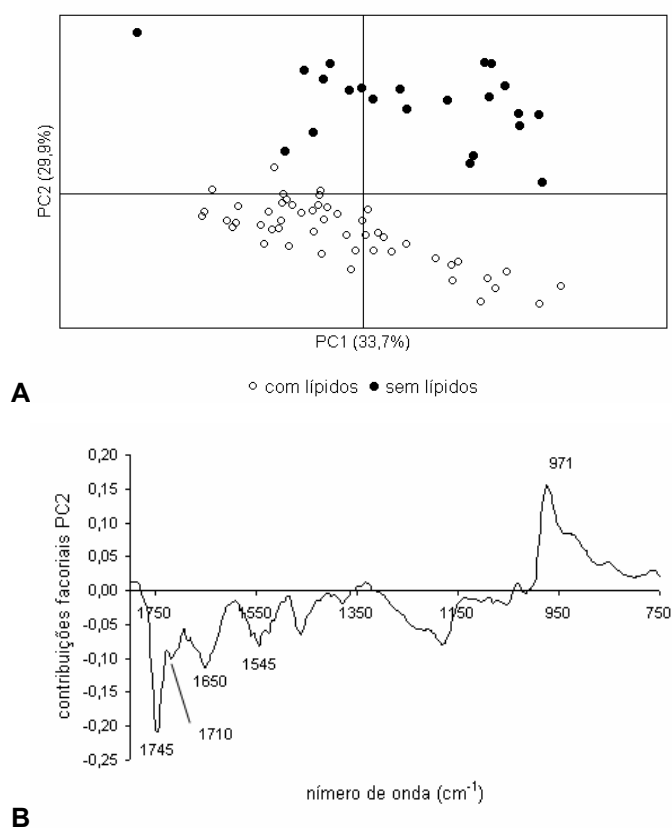
### 10.3.3 Efeito dos lípidos

#### 10.3.3.1 Eficiência da remoção de lípidos

De forma a pesquisar a eficiência da extracção com clorofórmio foram adquiridos espectros de FT-IR e de RMN da farinha antes e após a referida extracção.

##### • FT-IR

Após aquisição dos espectros de FT-IR, os espectros da farinha com e sem tratamento foram submetidas a análise em componentes principais, os resultados estão apresentados na Figura 10.6.

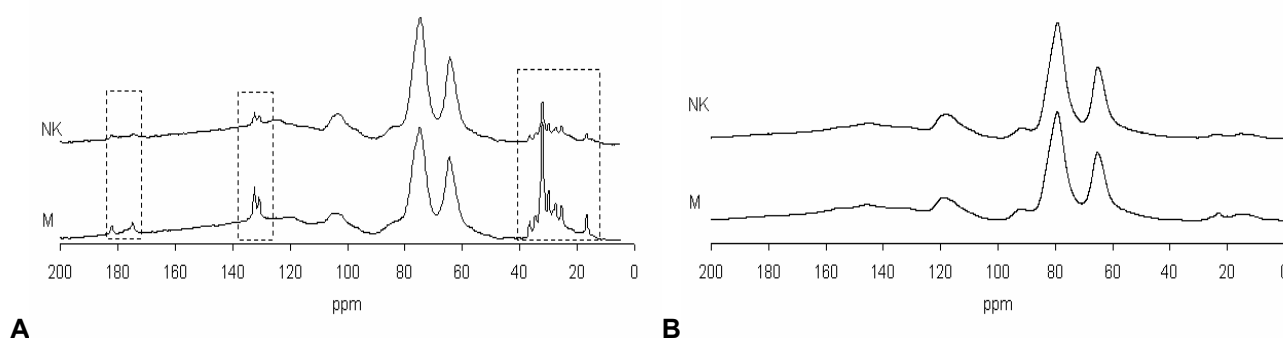


**Figura 10.6:** (A) Diagrama de coordenadas factoriais de PC1 vs PC2 e (B) diagrama das contribuições factoriais do PC2 referentes aos espectros de FT-IR das amostras de farinha ante e após a extracção com clorofórmio. Espectros analisados na sub-região 1800-550 cm<sup>-1</sup>.

De acordo com o diagrama de coordenadas factoriais PC1 vs PC2, a extracção com clorofórmio possibilitou a discriminação de dois grupos de amostras através do eixo PC2 (Figura 10.6 A). De acordo com o diagrama de contribuições factoriais (Figura 10.6 B), a discriminação através do referido eixo é devida principalmente a sinais localizados a  $1745\text{ cm}^{-1}$  (C=O – triglicéridos),  $1710\text{ cm}^{-1}$  (C=O – ácidos gordos),  $1650$  e  $1545\text{ cm}^{-1}$  (Amida I e II de proteína). Estes sinais estão correlacionados positivamente com as amostras localizadas na região negativa do PC2 – farinha sem extracção. Esta informação permite-nos concluir que aquando da extracção são extraídos maioritariamente lípidos (triglicéridos e ácidos gordos).

- RMN em estado sólido

Os espectros da farinha antes e após tratamento foram comparados e verificou-se que a extracção em causa conduziu à eliminação dos sinais característicos da presença de compostos lípidicos, de elevada mobilidade, na amostra. Na Figura 10.7 estão apenas apresentados os espectros de SPE  $^{13}\text{C}$  referentes às amostras de milho e de sorgo da variedade NK283 antes (A) e após (B) a extracção com clorofórmio.

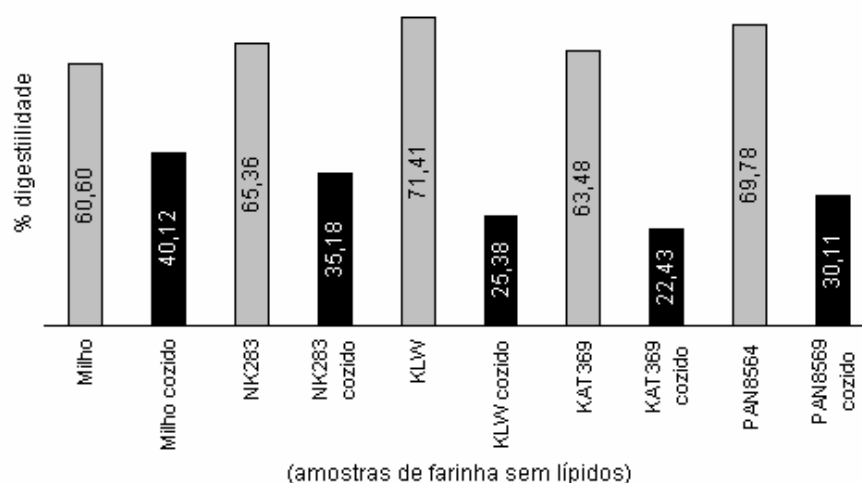


**Figura 10.7:** Espectros de SPE  $^{13}\text{C}$  das amostras de farinha de milho e de sorgo NK 283 antes (A) e após (B) extracção com clorofórmio.

Como se pode verificar na figura, sinais correspondentes à presença de lípidos (180, 130 e 40-20 ppm) desaparecem aquando da extracção atestando que a extracção a que as amostras foram submetidas é eficiente.

### 10.3.3.2 Efeito dos lípidos nos valores de digestibilidade

A digestibilidade da farinha sem lípidos, crua e cozida, foi também calculada e os resultados estão apresentados na Figura 10.8. Para a farinha crua sem lípidos foram encontrados valores de digestibilidade de 60,60% para o milho, 65,36% para o sorgo NK283, 71,41% para o sorgo K LW, 63,48% para o sorgo KAT369 e 69,78% para o sorgo PAN8563. No que diz respeito aos valores de digestibilidade para as amostras de farinha cozida sem lípidos foram encontrados valores de 40,12% para o milho e 35,18%, 25,38%, 22,43% e 30,11% para as quatro variedades de sorgo estudadas, respectivamente, NK283, K LW, KAT369 e PAN8563.



**Figura 10.8:** Percentagem da digestibilidade de amostras de farinha de milho e sorgo às quais foram removidos os lípidos e após serem submetidas a cozimento. Valores determinados a partir do teor em azoto em amostras digeridas e em amostras não digeridas.

Após comparar os valores de digestibilidade obtidos para a farinha crua sem lípidos com os valores de digestibilidade referentes às amostras de farinha com lípidos, verificou-se que eram bastante similares (Tabela 10.3).

Concluiu-se, então, que a remoção de lípidos não influencia a digestibilidade proteica da farinha crua.

**Tabela 10.3:** Percentagem da digestibilidade de amostras de farinha de milho e sorgo cruas e sem lípidos. Redução dos valores de digestibilidade com a remoção de lípidos.

	Digestibilidade (amostras cruas)	Digestibilidade (amostras cruas sem lípidos)	Redução da digestibilidade com remoção lípidos
Milho	65,98%	60,60%	8,15%
NK 283	68,63%	65,36%	4,76%
KLW	75,62%	71,41%	5,57%
KAT 369	66,79%	63,48%	4,96%
PAN 8569	71,70%	69,78%	2,68%

Na Tabela 10.4 estão registados os valores de digestibilidade da farinha cozida, assim como os valores referentes à variação da digestibilidade com a remoção de lípidos. Quando se comparam os valores da digestibilidade proteica referentes a amostras de farinha cozidas na presença ou ausência de lípidos verifica-se que a digestibilidade sofre um ligeiro incremento, no que diz respeito à farinha de sorgo (7,55% - NK283, 33,3% - KLW, 54,48% - KAT369 e 20,88% - PAN8569). Quanto à farinha de milho, o efeito é oposto ao de sorgo, ocorre uma diminuição da digestibilidade proteica (37,76%) quando o cozimento é efectuado sem amostras em lípidos.

Estes resultados parecem indicar que, na farinha de sorgo, o cozimento promove alterações estruturais que induzem a formação de complexos lípidos - proteínas que tornam as proteínas inacessíveis ao ataque de enzimas digestivas e, conseqüentemente, mais indigestíveis. Com remoção dos lípidos evita-se a formação de complexos lípidos – proteínas, ficando as proteínas disponíveis ao ataque enzimático. Claro que a remoção de lípidos não reverte completamente os valores de digestibilidade mas, como foi

referido, não se julga que seja um único factor isolado o responsável pela redução da digestibilidade com o cozimento.

**Tabela 10.4:** Percentagem da digestibilidade de amostras de farinha de milho e sorgo cozidas com e sem lípidos. Variação dos valores de digestibilidade ocasionadas pela remoção de lípidos.

	Digestibilidade (amostras cozidas)	Digestibilidade (amostras cozidas sem lípidos)	Variação da digestibilidade com a remoção lípidos
Milho	64,46%	40,12%	37,76% ↓
NK 283	32,71%	35,18%	7,55% ↑
KLW	19,04%	25,38%	33,30% ↑
KAT 369	14,52%	22,43%	54,48% ↑
PAN 8569	24,91%	30,11%	20,88% ↑

Nas amostras de milho o efeito nos valores de digestibilidade é oposto. De acordo com estudos de RMN SPE  $^{13}\text{C}$ , nesta amostra não se verificaram alterações estruturais, a nível da rigidez da fracção lípidica, com o cozimento.

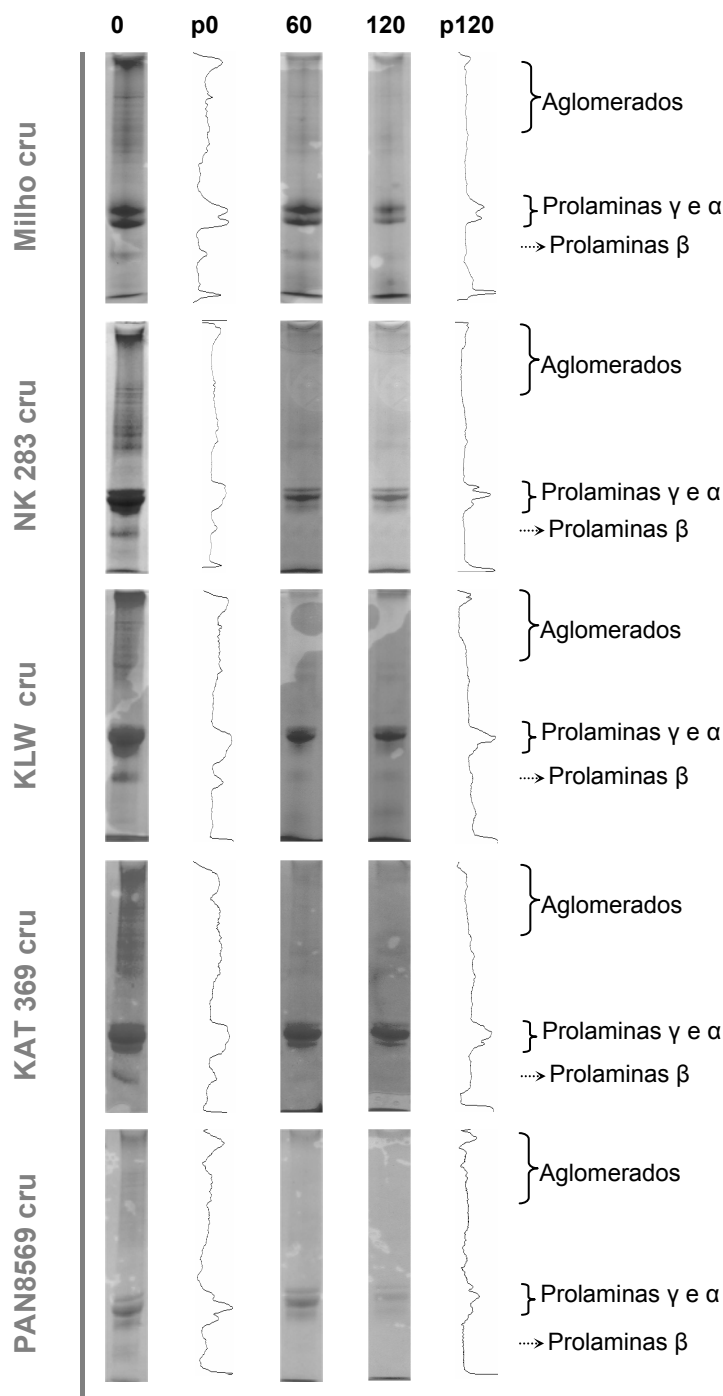
Efectuaram-se, ainda, ensaios de digestibilidade em amostras de farinha de sorgo cozida às quais foram posteriormente removidos os lípidos. Verificou-se que os valores de digestibilidade proteica aumentaram ligeiramente com a remoção de lípidos.

### 10.3.3.3 Efeito dos lípidos na digestibilidade sequencial

Na tentativa de conseguir compreender o papel dos lípidos na digestão proteica aplicou-se às amostras de farinha sem lípidos, cruas e cozidas, o procedimento de digestibilidade sequencial acompanhada por SDS-PAGE.

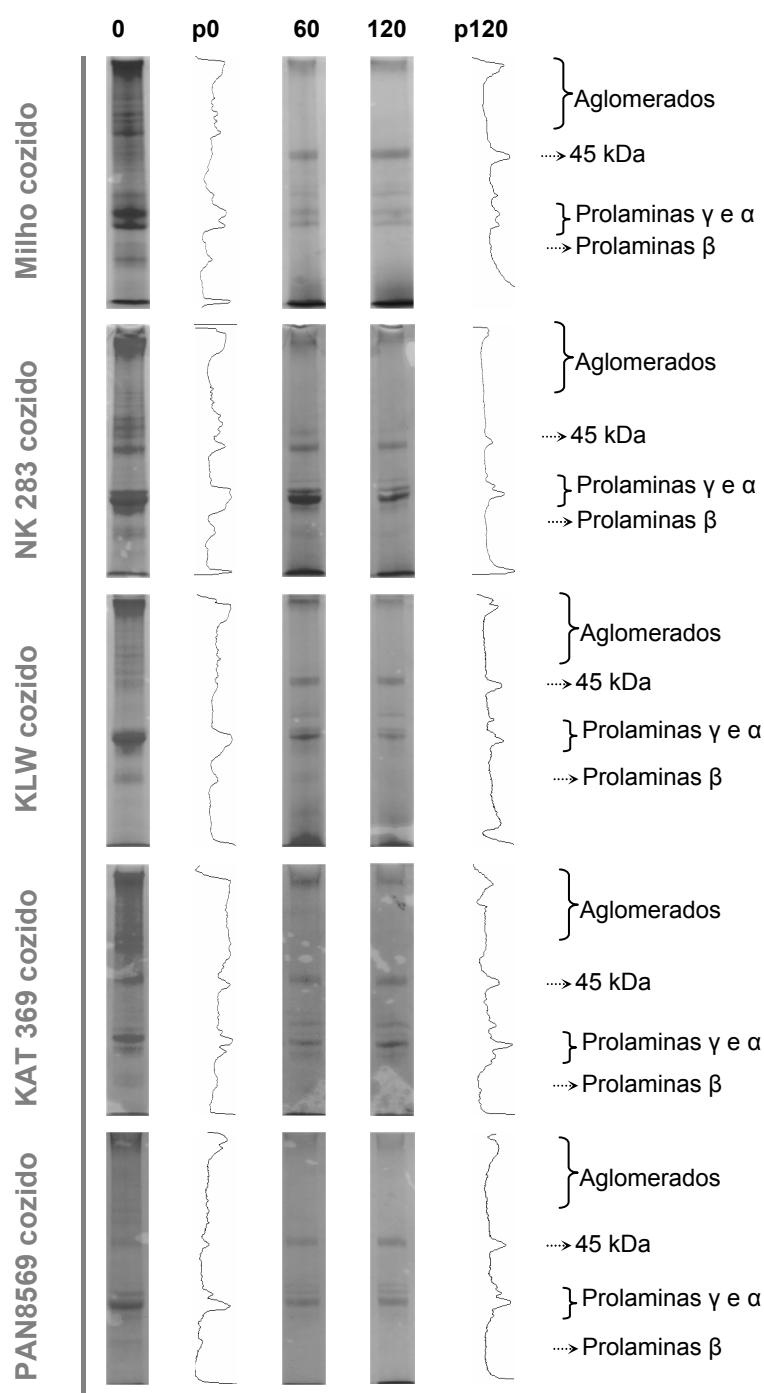
No que diz respeito às amostras de farinha crua sem lípidos pode verificar-se uma enorme similaridade entre os perfis electroforéticos destas amostras com os perfis electroforéticos das amostras cruas (*cf* Figura 10.9 e Figura 9.5). A semelhança entre esses perfis electroforéticos está de acordo

com similaridade entre valores de digestibilidade das amostras de farinha crua com e sem lípidos.



**Figura 10.9:** Electroforegramas correspondentes à digestão sequencial de farinha de milho e de sorgo cruas, após remoção de lípidos. Junto aos trilhos electroforéticos das amostras com 0 e 120 minutos são apresentados os respectivos perfis electroforéticos (p0 e p120, respectivamente).

Quando se analisaram os resultados referentes à digestibilidade sequencial de amostras de farinha cozidas sem lípidos verificou-se que em relação aos tempos de digestão zero os resultados são bastante similares, com o decorrer da digestão podem detectar-se algumas diferenças nas intensidades das bandas electroforéticas que resistem à digestão.



**Figura 10.10:** Electroforegramas correspondentes à digestão sequencial de farinha de milho e de sorgo cozidas após remoção de lípidos. Junto aos trilhos electroforéticos das amostras com 0 e 120 minutos são apresentados os respectivos perfis electroforéticos (p0 e p120, respectivamente).



Em relação à amostra de milho parece que, na amostra correspondente a 120 minutos de digestão, a banda do oligómero 45 kDa parece estar mais intensa que no caso da farinha cozida com lípidos.

Quando se trata das amostras de sorgo pode verificar-se que tanto as bandas referentes aos oligómeros de 45 kDa, como as referentes aos monómeros  $\gamma$  e  $\alpha$  são menos intensas no caso da farinha cozida sem lípidos.

Adicionalmente, nas amostras cozidas em que é característica a presença do oligómero de 47 kDa (amostras de digestibilidade inferior – KLW, KAT369 e PAN8569), quando são removidos os lípidos a sua presença não é detectada.

Estas observações podem servir para explicar o incremento dos valores de digestibilidade proteica da farinha de sorgo quando é cozida na ausência de lípidos assim como para explicar o facto da amostra de milho sofrer redução dos valores de digestibilidade proteica quando é cozida na ausência de lípidos (*cf* Figura 9.6 e Figura 10.10).

Perante estes resultados e, como foi referido anteriormente, a formação de complexos lípidos – proteínas, aquando do cozimento, podem contribuir para a redução da digestibilidade das farinhas de sorgo.

## 10. 4 Conclusões

A remoção de compostos fenólicos em variedades de sorgo sem taninos parece induzir redução dos valores de digestibilidade proteica das farinhas cruas, tanto sorgo como milho. A presença de compostos fenólicos nas amostras parece ajudar a solubilidade das proteínas, envolvendo-as, prevenindo a formação de interacções proteína-proteína. Desta forma, quando são removidos da farinha, as interacções hidrofóbicas estebelecidas entre proteínas são incrementadas e o ataque enzimático é dificultado; como consequencia há redução da digestibilidade.

Por sua vez, a remoção dos lípidos induz um incremento da digestibilidade proteica das amostras de sorgo cozidas. Contudo, esse

procedimento apresenta efeito antagónico nas amostras de milho. Os resultados espectroscópicos, em conjunto com estes novos dados podem indicar que há formação de complexos lípidos–proteínas. A formação destes complexos pode explicar, parcialmente, a redução da digestibilidade proteica com o cozimento da farinha de sorgo. Taha e Mohamed, 2004 atribuíram os baixos valores de digestibilidade das proteínas de soja à formação de interacções proteína–lípidos.

## 10. 5 Bibliografia

- Abd El-Motaal, E. A., Helmy, H. E., Taha, F. S. e Sohoeb, Z. E. (1998) Effect of dry and moist heating on the formation of lipid-protein complex in soy bean products *in* Proceedings of the 47th oil seed conference, New Orleans, Louisiana, March 8-10.
- Aboubacar, A.; Axtell, J.D.; Huang, C.-P. e Hamaker, B.R. (2001) A rapid protein digestibility assay for identifying highly digestible sorghum lines, *Cereal Chem.*, **78**(2): 160-165.
- Agudelo, R.A.; Fliedel, G. e Alarcón, O.M. (1997) Tannin elimination and improvement of the digestibility of protein sorghum grains, *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, **47**(2): 131-136.
- Armstrong, W.D.; Rogler, J.C. e Featherston, W.R. (1974) Effect of tannin extraction on the performance of chicks fed bird resistant sorghum grain diets, *J. C. Poultry Sci.*, **53**: 2137-2142.
- Babiker, E.E. e El-Tinay, A.H. (1992) Effect of alkali on tannin content and in vitro protein digestibility of sorghum cultivars, *Food Chem.*, **45**: 55-60.
- Bullard, R.W.; York, J.O. e Kilburn, S.R. (1981) Polyphenolic changes in ripening bird resistant sorghums, *J.Agric. Food Chem.*, **29**:973-981.
- Burns, R.E. (1971) Method for estimation of tannin in grain sorghum, *Agron. J.*, **63**: 511-512.
- Butler, L. (1982) Relative degree of polymerisation of sorghum tannin during seed development and maturation, *J.Agric. Food Chem.*, **30**:1090-1094.

- Chavan, J.K.; Kadam, S.S. e Salunkhe, D.K. (1981) Changes in tannin, free amino acids, reducing sugar and starch during germination of low and high tannin cultivars of sorghum, *J. Food Sci.*, **46**: 638-639.
- Chavan, J.K.; Kadam, S.S.; Ghonsikar, C.P. e Salunkhe, D.K. (1979) Removal of tannins and improvement of in vitro protein digestion of sorghum seeds by soaking in alkali, *J. Food Sci.*, **44**: 1319-1321.
- Chibber, B.A.; Mertz, E.T. e Axtell, J.D. (1980) *In vitro* protein digestibility of high tannin sorghum at different stages of dehulling, *J. Agric. Food Chem.*, **28**:160-161.
- Eggum, B.O. e Christensen, K.D. (1975) Influence of tannin on protein utilization in feedstuffs with special reference to barley *em* Breeding for seed protein improvement using nuclear technics, OIEA, Viena.
- Elkin, G.E.; Freed, M.B.; Hamaker, B.R.; Zhang, Y. e Parsons, C.M. (1996) Condensed tannins are only responsible for variations in nutrient digestibilities of sorghum grain cultivars, *J. Agric. Food Chem.*, **44**: 848-853.
- Emmambux, N.M. e Taylor, J.R.N. (2003) Sorghum kafirina interaction with various phenolic compounds, *J. Sci. of Food and Agric.*, **83**: 402-407.
- Englyst, H.N.; Anderson, V. e Cummings, J.H. (1983) *J. Sci. Food Agric.*, **34**: 1434-1440
- Harris, H.B. e Burns, R.E. (1973) Relationship between tannin content of sorghums grain and preharvest seed moulding, *Agron. J.*, **65**: 957-959.
- Marquardt, R.R; Campbell, L.D. e Ward, A.T. (1976) Studies with chicks on the growth depressing factors in faba bean, *J. Nutrition*, **106**: 275-284.
- Nunes, A. (2000) Contribuição para a caracterização da fracção de prolaminas de duas variedades de sorgo, Universidade de Aveiro.
- Price, M.L. e Butler, L.G. (1978) Detoxification of high-tannin sorghum grain, *Nutr. Rep. Int.*, **17**: 229-235.
- Price, M.L. e Butler, L.G. (1979) Rapid visual estimation and spectrophotometric determination of tannin content of sorghum grain, *J.Agric. Food Chem.*, **25**:1268-1273.

- Price, M.L.; Hagerman, A.E. e Butler, L.G. (1980) Tannin in sorghum grain: effect of cooking on chemical assays and on antinutritional properties in rats, *Nutr. Rep. Int.*, **27**: 761-767.
- Price, M.L.; Stromberg, A.M. e Butler, L.G. (1979) Tannin content as a function of grain maturity and drying conditions in several varieties of sorghum bicolor (L.) Moench, *J. Agric. Food Chem.*, **27**(6): 1270-1274.
- Reichert, R.D.; Fleming, S.E. e Schwab, D.J. (1980) Tannin deactivation and nutritional improvement of sorghum by anaerobic storage of H<sub>2</sub>O-, HCl-, or NaOH- treated grain, *J. Agric. Food Chem.*, **28**: 824-829.
- Sieber, K.J., Troukhanova, N.V. e Lynn, P.Y. (1996) Nature of polyphenol interactions, *J. Agric. Food Chem.*, **44**: 80-85.
- Taha, F. S. e Mohamed, S. S. (2004) Effect of different denaturing methods on lipid protein complex formation. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, **37**: 99-104.
- Tamir, M. e Alumot, E. (1969) Inhibition of digestive enzymes by condensed tannins from green and ripe carpos, *J. Sci. Food Agric.*, **20**: 199-202.
- Tipton, K.W.; Floyd, E.M.; Marshall, J.G. e McDevitt, J.B. (1970) Resistance of certain grain sorghum hybrids to bird damage in Louisiana, *Agron. J.*, **62**: 211-213.
- Weaver, C.A.; Hamaker, B.R. e Axtell, J.D. (1998) Discovery of grain sorghum germ plasm with high uncooked and cooked *in vivo* protein digestibility, *Cereal Chem.*, **75**: 665-670.
- Zhang, G. e Hamaker, B.R. (2004) Starch-free fatty acid complexation in the presence of whey protein, *Carbohydrate Polymers*, **55**: 419-424.

## Estudo da gelatinização do amido por 2D-COS

### 11.1 Introdução

O amido existe na natureza na forma de grânulos insolúveis (2 to 150 mm) que apresentam estrutura semi-cristalina. Nas plantas verdes são a forma de se armazenar energia durante largos períodos de tempo (Othmer, 1983).

Na composição de amido comercial, para além do amido (27-31% amilose e 69-73% amilopectina), podem encontrar-se pequenas quantidades de água (11-14%), proteína (0,1-0,6%) e lípidos (0,7-1,2%) (Galliard e Bowler, 1987). Os componentes maioritários do amido (amilose e amilopectina) apresentam-se em estruturas semi-cristalinas. A amilose é um polímero linear composto por D-glucose estabelecendo ligações  $\alpha$  (1-4). A amilopectina é um polissacarídeo altamente ramificado composto por D-glucose estabelecendo ligações  $\alpha$ (1-4) e  $\alpha$ (1-6) (Othmer, 1983). Na natureza, esta cadeia assume uma estrutura quase cristalina, para além do elevado grau de ramificação (Tester *et al.* 2004).

A gelatinização do amido é o processo pelo qual os grânulos de amido perdem a sua estrutura semi-cristalina como consequência do aumento de temperatura (Tester *et al.* 2004). A energia cinética das moléculas aumenta com a temperatura e as ligações por pontes de hidrogénio são clivadas. O processo de gelatinização pode ser considerado como um processo de fusão assistido pela água. Os grânulos de amido são, apenas, destruídos quando aquecidos na presença de água. Se a água não está presente começam a ser degradados mesmo antes de fusão. Quando o processo de aquecimento

ocorre na presença de água os grânulos hidratam e sofrem um grande aumento de volume resultando, simultaneamente, na perda do material solúvel, como é o caso da amilose (Tester *et al.* 2004).

Quando o amido gelatinizado arrefece, a viscosidade aumenta, formando-se uma pasta altamente viscosa. Este processo é designado retrogradação (recristalinização) das moléculas de amilose. Este fenómeno, dependente do tempo, depende da concentração de amilose e amilopectina, peso molecular destes polímeros, temperatura, pH e componentes não amiláceos presentes na amostra (Beleia *et al.* 1996).

Espectroscopia de infravermelho com transformadas de Fourier (FT-IR) tem vindo a ser utilizada para estudar o comportamento do amido isolado e em sistemas complexos (Belton *et al.* 1991; Goodfellow e Wilson, 1990; Wilson e Belton, 1988). Esta técnica, por ser não invasiva, permite a observação directa de alterações de grupos funcionais específicos (Belton *et al.* 1991).

Estudos prévios indicaram que a região espectral entre 1200 e 900  $\text{cm}^{-1}$  é a mais indicada para estudar alterações conformacionais na estrutura molecular de amilose e amilopectina (Goodfellow e Wilson, 1990; Wilson e Belton, 1988). Os picos localizados nesta região resultam de desvios angulares de ligações C-OH e C-C. Estes grupos funcionais fazem parte do esqueleto das moléculas de amido. As ligações por pontes de hidrogénio desempenham um papel fulcral na estrutura cristalina do amido.

Julga-se que quando ocorre gelatinização em sistemas complexos outros componentes do sistema possam interferir, ajudando ou evitando a destruição da estrutura cristalina, favorecendo ou dificultando a quebra das ligações por pontes de hidrogénio.

## 11.2 Metodologia

- 1º Aquecimento progressivo do amido/farinha em água (30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 95 °C).
- 2º Arrefecimento das amostras após atingir a temperatura desejada.
- 3º Liofilização das amostras.
- 4º Aquisição de espectros de FT-IR.
- 5º Análise dos espectros por 2D-COS.

### 11.2.1 Preparação das amostras

Foi estudada a gelatinização de amido de milho e o seu comportamento foi comparado com a gelatinização de sistemas complexos – farinha de milho e farinha de sorgo.

Para cada amostra (amido de milho purificado, farinha de milho e farinha de sorgo) foram adicionados 8 x 1 mL de água a 8 x 100 mg de farinha. As amostras foram colocadas em banho de água com temperatura controlada e submetidos a incrementos sucessivos de temperatura (30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 95 °C). Após as amostras atingirem a temperatura desejada foram arrefecidas em banho de gelo, em seguida foram congeladas e posteriormente liofilizadas.

### 11.2.2 Análise por FT-IR

O espectro de FT-IR foi obtido directamente a partir das amostras em estado sólido. Os espectros foram adquiridos na gama de 4000 a 500  $\text{cm}^{-1}$  com resolução de 8  $\text{cm}^{-1}$  (na gama de infravermelho médio) num espectrómetro Bruker IFS 55 com acessório Golden Gate (sistema de ATR de reflexão única), com acumulação de 256 scans. Foram realizadas cinco réplicas de cada amostra.

### 11.2.3 Análise por FT-IR

A espectroscopia de correlação bi-dimensional (2D-COS) é uma técnica espectral desenvolvida por Noda (1989) para analisar conjuntos de resultados que foram obtidos por uma perturbação externa sequencial (como é o caso de alterações controladas de temperatura). Esta análise, baseada em técnicas espectroscópicas bi-dimensionais, visa a recuperação de informação distribuindo os sinais espectroscópicos por uma segunda dimensão (Noda, 1990; Noda *et al.* 2000). Este método detecta correlações fasadas (mapa síncrono) e desfasadas (mapa assíncrono) entre variações de intensidade espectral que ocorrem em pontos distintos do espectro e que são estimuladas pela perturbação externa (Noda, 1990; Noda *et al.* 1993; Noda *et al.* 2000; Lefèvre *et al.* 2004).

O mapa de intensidades de correlações síncronas ( $\Phi$ ) representas as similaridades entre duas variações espectrais distintas, enquanto que o mapa assíncrono ( $\Psi$ ) descreve as diferenças entre as variações de intensidade espectral (Noda *et al.* 2000).

Desta forma, o conceito da espectroscopia 2D pode ser transposto para homoespectros quando a mesma região espectral é usada para construir os mapas de correlação em função de fenómenos externos, como por exemplo a variação de um espectro com a temperatura. Da mesma forma, podem ser utilizados heteroespectros quando se combinam dois domínios espectrais distintos, como por exemplo FT-IR e RMN.

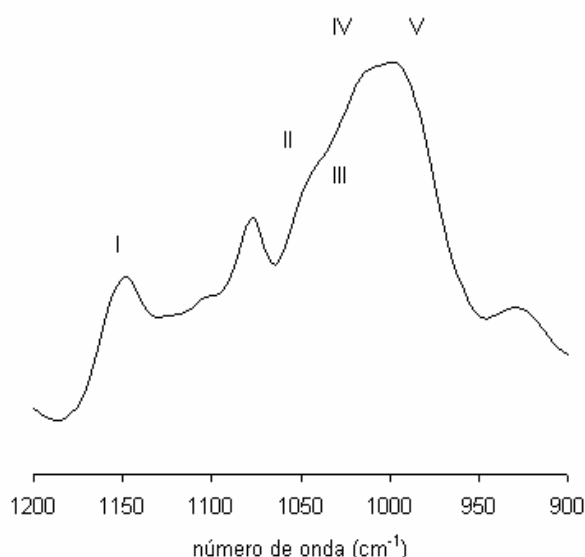
## 11.3 Resultados e discussão

O FT-IR é uma técnica poderosa para estudar alterações conformacionais em biopolímeros, tais com o amido (Goodfellow e Wilson, 1990) e pode ser usada para seguir as transformações ocorridas aquando



gelatinização. As referidas alterações podem ser estudadas, no caso do amido, na região espectral entre 1200 – 900  $\text{cm}^{-1}$ .

A Figura 11.1. mostra uma espectro típico do amido de milho na presença de excesso de água e à temperatura de 30°C. A forma, posição e intensidade desses picos dependem da natureza do amido, assim como da presença de outras substâncias na amostra.



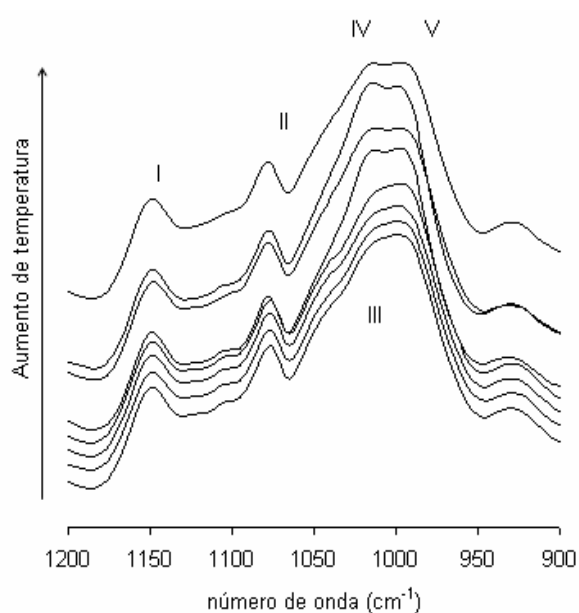
**Figura 11.1:** Espectro de FT-IR típico do amido de milho purificado na presença de excesso de água e à temperatura de 30°C.

No espectro apresentado na Figura 11.1 estão assinalados as bandas que vulgarmente se utilizam para a análise de alterações conformacionais do amido.

A Banda I (1145  $\text{cm}^{-1}$ ) não sofre alterações com as condições experimentais sendo utilizada como banda referência. A Banda II (1041  $\text{cm}^{-1}$ ) representa a região cristalina do amido e a sua intensidade aumenta com o aumento da estrutura cristalina do amido. A 1029  $\text{cm}^{-1}$  está localizada uma Banda III (ombro). Esta banda localizada entre a banda associada à região cristalina (1041  $\text{cm}^{-1}$ ) e a banda associada à região amorfa (1014  $\text{cm}^{-1}$ ), representa alterações de razão região amorfa/região cristalina, tornando-se menos distinto à medida que a região amorfa aumenta. A Banda IV (1014  $\text{cm}^{-1}$ ) é a mais larga e intensa, representa a quantidade de amido amorfo na amostra. Esta banda aumenta com a temperatura uma vez que o aumento da temperatura conduz ao aumento das regiões amorfas.

Finalmente, a Banda V ( $995\text{ cm}^{-1}$ ) está associada a região hidratadas da amostra e torna-se mais visível com o aumento da temperatura (Goodfellow e Wilson, 1990; Lorenz e Kulp 1991; Fawcett 1996).

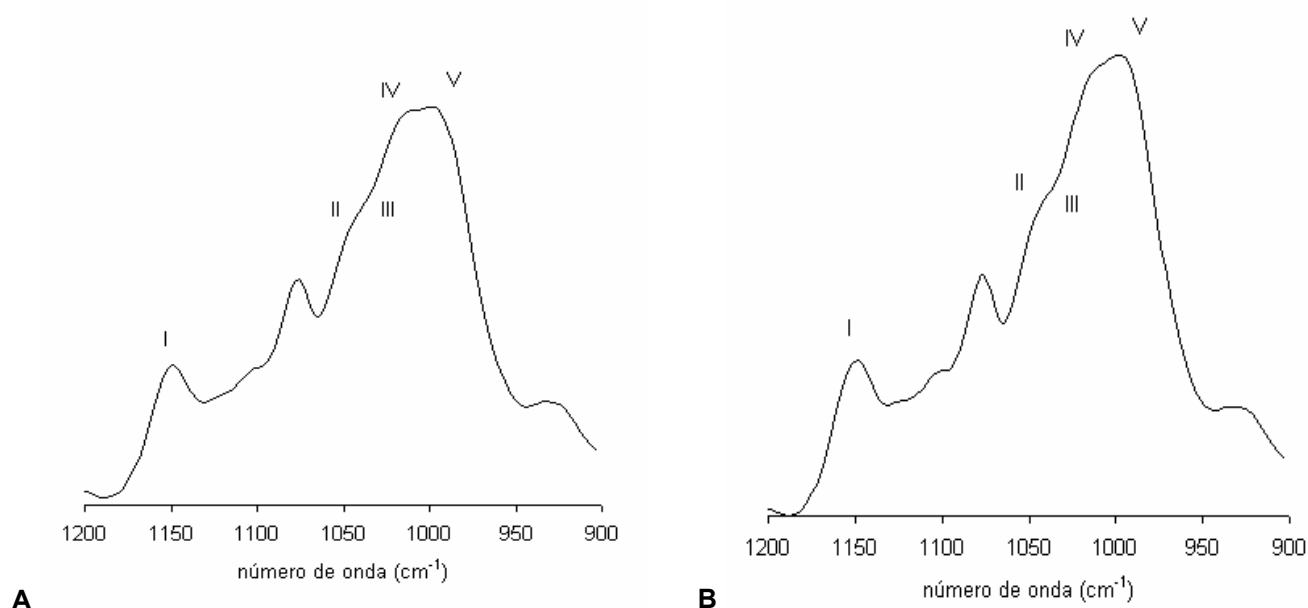
As alterações observadas na forma e intensidade das bandas são utilizadas para a identificação de alterações provocadas pela gelatinização do amido.



**Figura 11.2:** Espectros de FT-IR do amido de milho purificado na presença de excesso de água após ter sido aquecido a 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 95°C.

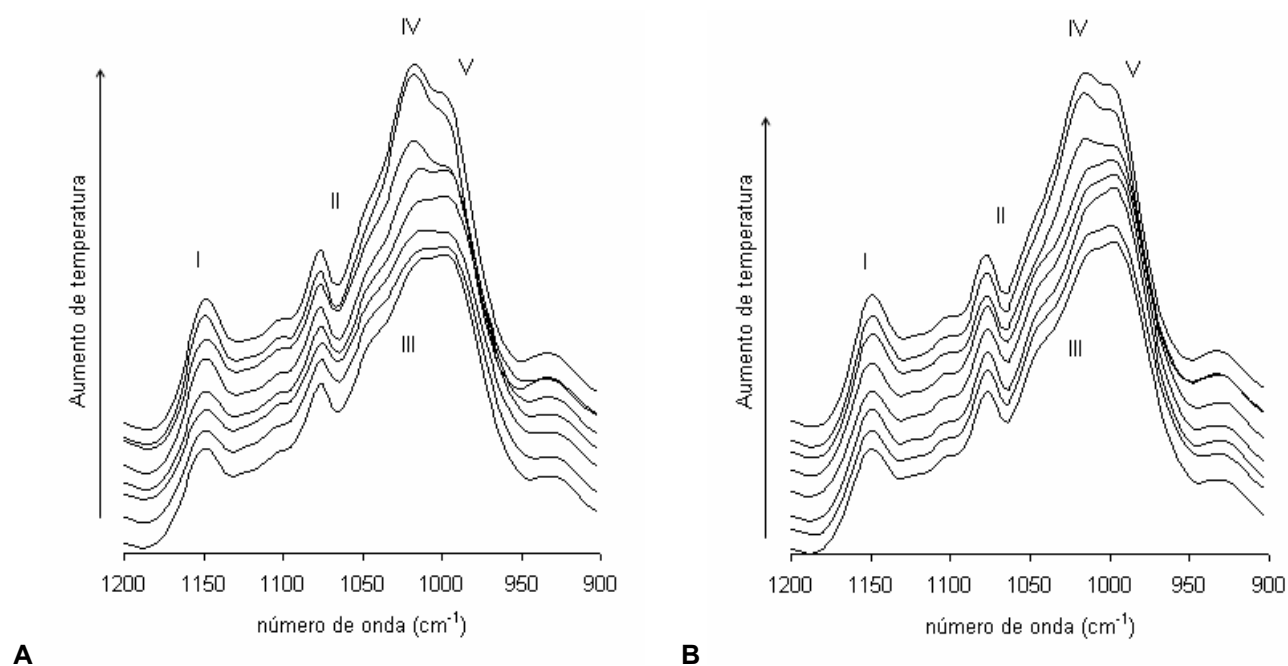
As alterações espectrais ocasionadas pelo aumento de temperatura em amido purificado são apresentadas na Figura 11.2.. Como foi referido anteriormente, as regiões cristalinas do amido são identificadas pela banda II ( $1041\text{ cm}^{-1}$ ). Esta banda, que pode ser usada para seguir alterações na região cristalina, diminui com a gelatinização uma vez que esta induz destruição da estrutura cristalina. O ombro a  $1029\text{ cm}^{-1}$  também diminui com a temperatura. A Banda IV ( $1014\text{ cm}^{-1}$ ), que representa a proporção amorfo/cristalino nos grânulos de amido, aumenta com a temperatura devido ao aumento da região amorfa aquando da gelatinização.

O FT-IR mostrou ainda ser bastante útil para estudar amido em sistemas complexos (Goodfellow e Wilson, 1990; Wilson e Belton, 1988), por esse motivo o mesmo estudo foi aplicado a amostras de farinha de milho e sorgo.



**Figura 11.3:** Espectros de FT-IR do milho (A) e de sorgo (B) na presença de excesso de água e à temperatura de 30°C.

Os espectros correspondentes à região da *impressão digital* da farinha de milho e de sorgo são bastante similares (Figura 11.3). Em ambos os espectros podem ser detectados as bandas características do amido (I, II, III, IV e V) que foram anteriormente detectadas para amido de milho (Figura 11.1).

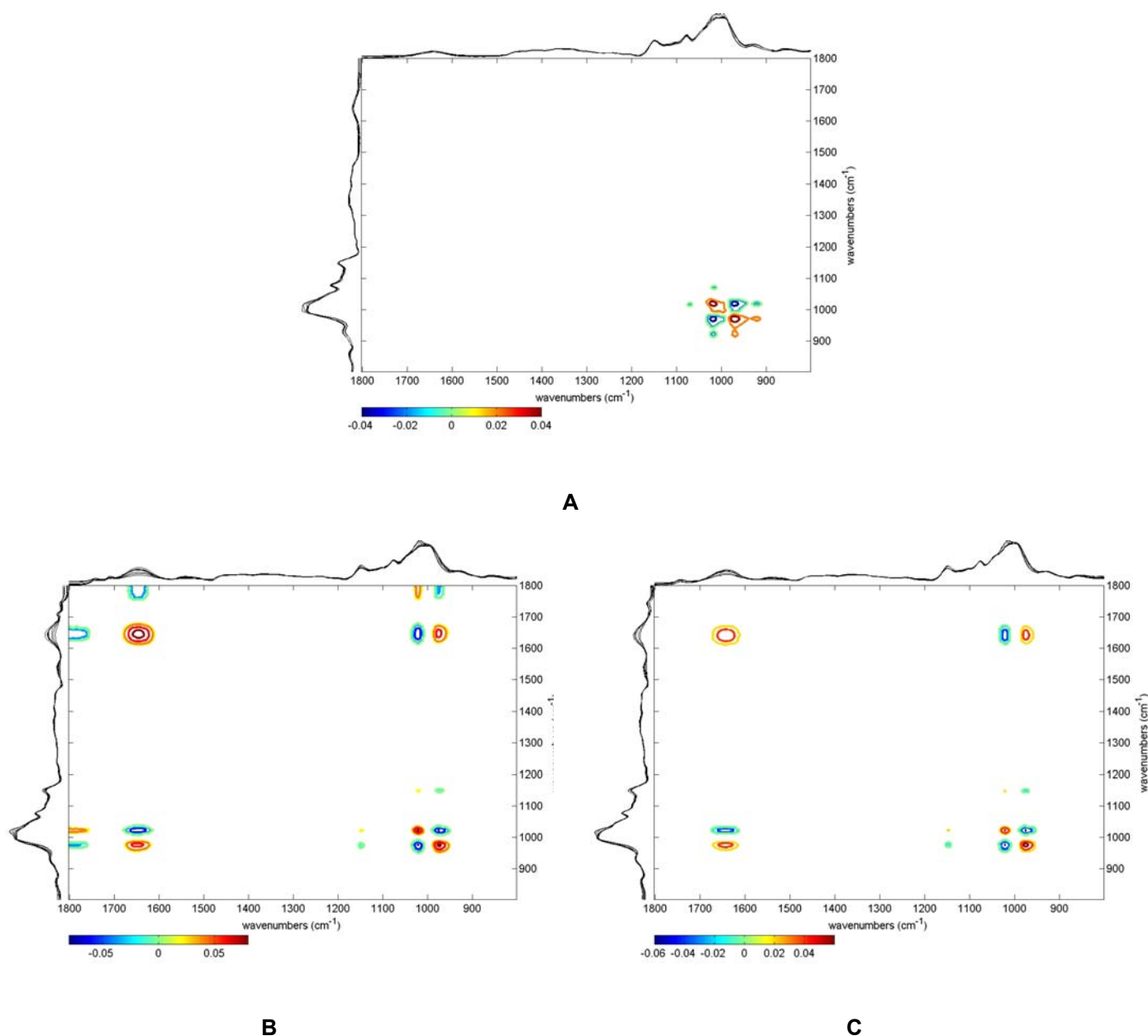


**Figura 11.4:** Espectros de FT-IR do milho (A) e de sorgo (B) na presença de excesso de água e após aquecimento a 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 95°C.

Quando é induzida gelatinização em sistemas complexos, como é o caso de cereais, podem ser detectadas diferenças interessantes. As alterações nas bandas I, II, III, IV e V do sorgo são similares às detectadas para o amido de milho, no entanto são mais intensas. Estas diferenças de comportamento podem ser associadas a possíveis interações entre amido e outros constituintes da farinha aquando da gelatinização do amido. Para além do milho pertencer à mesma família do sorgo, o comportamento do amido de milho face ao aquecimento é consideravelmente distinto (Figura 11.4).

À semelhança do que ocorre no amido purificado, nos cereais, com o aumento de temperatura a banda II desaparece e a Banda III torna-se menos distinta. A Banda IV aumenta acentuadamente com a temperatura devido ao aumento das regiões amorfas. No que diz respeito a esta banda, parece que no caso do milho haverá maior percentagem de amido amorfo, em comparação com o sorgo.

Para além de todos os estudos efectuados acerca da gelatinização do amido com FT-IR, o processo é muito complexo e consequentemente difícil de explicar apenas analisando o que ocorre na região espectral  $1200-900\text{ cm}^{-1}$ . Assim sendo, quando se estudam misturas complexas (cereais) será importante estudar variações de outros componentes, para além do amido. Será também conveniente estudar velocidades de variação e interações entre o amido e os restantes constituintes da amostra. De forma a conseguir um estudo deste tipo há necessidade de aplicar diferentes metodologias ao estudo dos sinais de FT-IR e, consequentemente, alargar a região espectral de  $1200-900\text{ cm}^{-1}$  para  $1800-900\text{ cm}^{-1}$ . Assim deixaremos de estudar apenas o amido e conseguiremos detectar alterações de outros componentes da farinha, tais como proteína e lípidos (ácidos gordos e triglicéridos).



**Figura 11.5:** Mapas síncronos de amido de milho (**A**), farinha de milho (**B**) e farinha de sorgo (**C**) em função da temperatura.

Tanto o aumento da região espectral como a aplicação de metodologias apropriadas (2DCOS) possibilitou, não só, a confirmação das modificações nos outros componentes das amostras, mas também, a identificação de correlações estabelecidas entre outros componentes da farinha (amido/proteína/lípidos).

Pela análise dos mapas síncronos para cada uma das farinhas poder-se-á estudar as variações simultâneas entre bandas.

De uma forma geral, pode observar-se que o mapa síncrono do amido de milho (Figura 11.5 A) é mais simples do que os mapas das duas restantes farinhas (milho - Figura 11.5 B e sorgo - Figura 11.5 C). Assim, e para o amido de milho, observam-se dois auto-picos a  $970$  e  $1019\text{ cm}^{-1}$ , sugerindo que estes dois picos representam a maior variação em função da temperatura e correspondem, respectivamente às bandas V e IV. No que diz respeito aos picos cruzados observam-se correlações síncronas entre  $1019$  e  $970\text{ cm}^{-1}$ , entre  $1070$  e  $1019\text{ cm}^{-1}$  e entre  $1019$  e  $922\text{ cm}^{-1}$ , todos estes apresentando correlações negativas. O sinal destas correlações sugere que quando uma das bandas de cada par aumenta de intensidade em função da temperatura a outra banda diminui. Foi, também, detectada uma correlação positiva entre  $970$  e  $922\text{ cm}^{-1}$ . Essas duas bandas variam na mesma direcção (aumentando ou diminuindo) e estão provavelmente relacionadas com alterações no esqueleto das moléculas de amido.

Nos mapas síncronos das farinhas de milho e sorgo (Figura 11.5 B e C) observam-se os mesmos auto-picos a  $970$ ,  $1019$  e  $1650\text{ cm}^{-1}$ . As duas primeiras bandas são comuns ao amido de milho, aparecendo ainda uma banda localizada a  $1646\text{ cm}^{-1}$  que também varia de uma forma significativa com a temperatura. Este último sinal indica que as proteínas são também afectadas com a temperatura e parece sugerir possíveis relações entre proteína/amido. O perfil dos picos cruzados nos mapas das farinhas de milho e sorgo (Figura 11.5 B e C) é bastante diferente do amido de milho (Figura 11.5 A). Também são detectadas algumas diferenças entre os mapas das farinhas de milho e de sorgo.

No mapa síncrono do milho são observadas correlações síncronas entre  $1790$  e  $970\text{ cm}^{-1}$ ,  $1650$  e  $1022\text{ cm}^{-1}$ ,  $1019$  e  $970\text{ cm}^{-1}$ . Estas três correlações síncronas, sendo negativas, sugerem que quando uma das bandas de cada par aumenta de intensidade em função da temperatura, a outra banda respectiva diminui. Foram também detectadas correlações entre  $1790$  e  $1019\text{ cm}^{-1}$ ,  $1790$  e  $1650\text{ cm}^{-1}$  e  $1650$  e  $970\text{ cm}^{-1}$  todas positivas e intensas, isto significa que as bandas do mesmo par aumentam ou diminuem em função da temperatura. Este último par de correlação sugere que, quando os sinais dos amidos relacionados com a estrutura cristalina diminuem os sinais relacionados com a proteína também diminuem. Este comportamento pode

estar relacionado com o facto de com o aumento da temperatura a proteína ir ficando mascarada com o amido gelatinizado e, consequentemente, parece estar presente em menor quantidade.

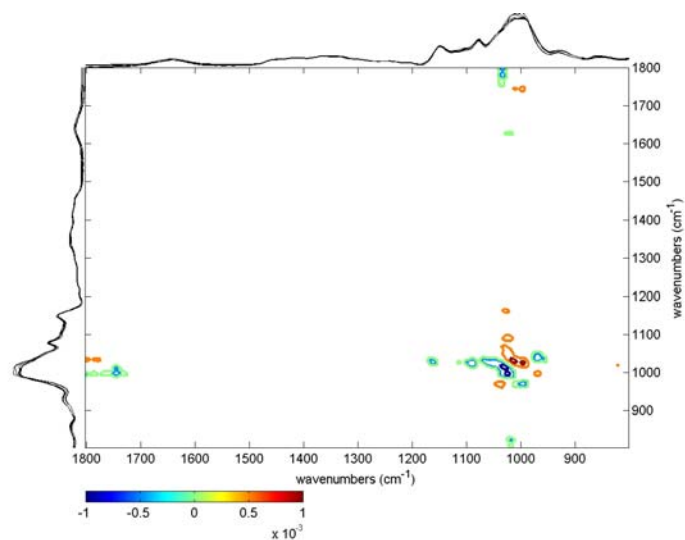
Em resumo, nos mapas síncronos do milho foram detectadas correlações entre lípidos (triglicéridos e lípidos oxidados) e amido e/ou proteína; o sinal a  $1790\text{ cm}^{-1}$  (característico dos lípidos) varia na mesma direcção dos sinais referentes ao amido cristalino e variam em direcção oposta dos sinais referentes ao amido amorfo e da proteína.

No mapa síncrono do sorgo os picos cruzados mostram correlações negativa entre  $1019$  e  $970\text{ cm}^{-1}$  e entre  $1650$  e  $1019\text{ cm}^{-1}$ . Uma correlação positiva foi detectada entre  $1650$  e  $970\text{ cm}^{-1}$ . Como se pode verificar, podem ser detectadas, apenas, correlações entre proteína e amido. Tal como no caso do mapa síncrono do milho, o sinal da proteína varia na mesma direcção que o sinal correspondente ao amido amorfo e em direcção oposta dos sinais de amido cristalino.

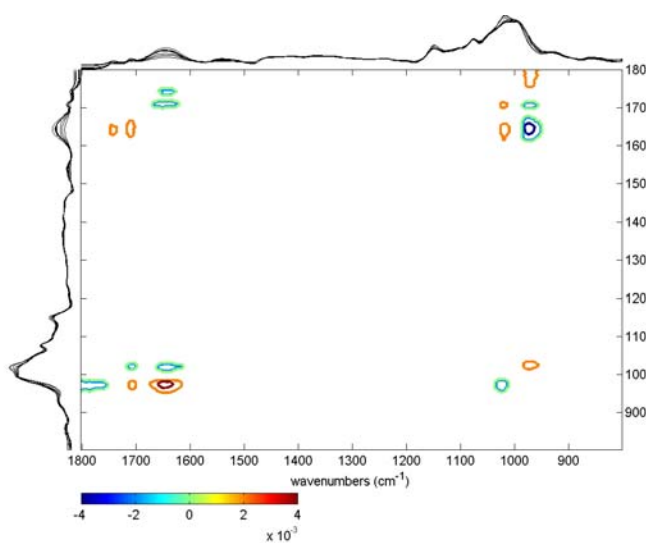
Pela análise dos mapas assíncronos poder-se-á analisar a alteração no *ratio* ou na *velocidade* entre duas bandas correlacionadas. Esses mapas mostram-nos as relações e os diferentes comportamentos entre as espécies.

A Tabela 11.1 aparenta todas as correlações representadas nos mapas assíncronos. A interpretação dos pares de sinais, no que diz respeito à ordem pela qual elas variam, é baseada, também, na informação contida no mapa síncrono correspondente.

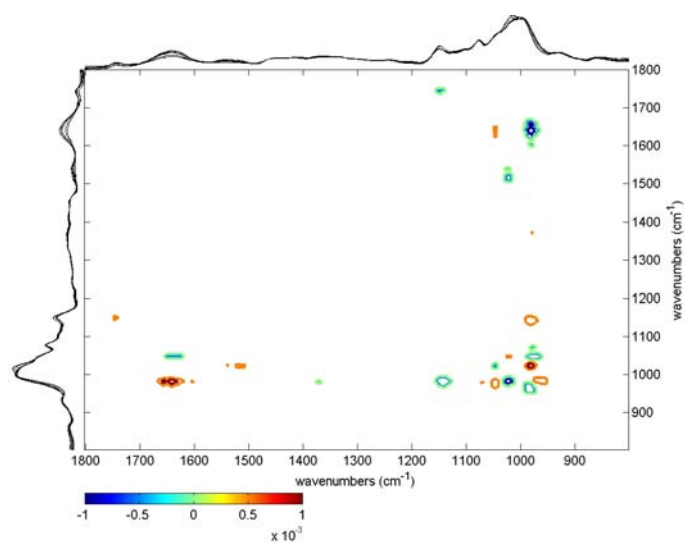
Alguns dos sinais dos mapas assíncronos do amido de milho (Figura 11.6 A) sugerem que: i) o sinal a  $1034\text{ cm}^{-1}$  varia antes do sinal a  $1781\text{ cm}^{-1}$ ; ii) o sinal a  $1034\text{ cm}^{-1}$  varia antes do sinal a  $1801\text{ cm}^{-1}$ ; iii) o sinal a  $1743\text{ cm}^{-1}$  varia antes do sinal a  $1011\text{ cm}^{-1}$ ; e o sinal localizado a  $1743\text{ cm}^{-1}$  varia antes do encontrado a  $995\text{ cm}^{-1}$ . Estas correlações sugerem que, alterações na cristalinidade do amido induzem alterações tanto nos lípidos oxidados como nos triglicéridos, depois destas alterações ocorrerem o sistema passa a ser amorfo. As correlações assíncronas entre lípidos e amido sentidas numa amostra de amido de milho, poderão ser originadas pelos lípidos localizados à superfície dos grânulos de amido e dos quais são difíceis de separar.



**A**



**B**



**C**

**Figura 11.6:** Mapas assíncronos de amido de milho purificado (A), farinha de milho (B) e farinha de sorgo (C) em função da temperatura.



**Tabela 11.1:** Correlações entre sinais assíncronos observados nos mapas correspondentes.

Amido de milho		
v1	v2	
995	971	v1 sofre alterações <b>depois</b> de v2
1026	998	v1 sofre alterações <b>antes</b> de v2
1030	1014	v1 sofre alterações <b>antes</b> de v2
1037	968	v1 sofre alterações <b>antes</b> de v2
1018	822	v1 sofre alterações <b>depois</b> de v2
1091	1026	v1 sofre alterações <b>depois</b> de v2
1160	1029	v1 sofre alterações <b>depois</b> de v2
1743	995	v1 sofre alterações <b>antes</b> de v2
1743	1011	v1 sofre alterações <b>antes</b> de v2
1781	1034	v1 sofre alterações <b>depois</b> de v2
1801	1034	v1 sofre alterações <b>depois</b> de v2
Milho		
v1	v2	
1022	974	v1 sofre alterações <b>depois</b> de v2
1655	1022	v1 sofre alterações <b>depois</b> de v2
1655	974	v1 sofre alterações <b>depois</b> de v2
1710	974	v1 sofre alterações <b>depois</b> de v2
1710	1022	v1 sofre alterações <b>depois</b> de v2
1782	974	v1 sofre alterações <b>depois</b> de v2
1744	1640	v1 sofre alterações <b>antes</b> de v2
1710	1640	v1 sofre alterações <b>depois</b> de v2
Sorgo		
v1	v2	
983	964	v1 sofre alterações <b>antes</b> de v2
1022	983	v1 sofre alterações <b>depois</b> de v2
1049	976	v1 sofre alterações <b>depois</b> de v2
1045	1022	v1 sofre alterações <b>depois</b> de v2
1145	980	v1 sofre alterações <b>depois</b> de v2
1369	980	v1 sofre alterações <b>depois</b> de v2
1519	1022	v1 sofre alterações <b>antes</b> de v2
1639	987	v1 sofre alterações <b>depois</b> de v2
1658	987	v1 sofre alterações <b>depois</b> de v2
1640	1019	v1 sofre alterações <b>antes</b> de v2
1743	1149	v1 sofre alterações <b>antes</b> de v2

Os mapas correspondentes às farinhas de milho e sorgo apresentam mais correlações assíncronas fora da região da *impressão digital* (Figura 11.6 B e C). No entanto, o mapa assíncrono do milho é bastante distinto do do sorgo.

Pela análise simultânea dos mapas de correlação síncrona (Figura 11.5 B) e assíncrona (Figura 11.6 B) da farinha de milho, temos que i) a banda

localizada a  $1022\text{ cm}^{-1}$  sofre alterações antes da localizada a  $1655\text{ cm}^{-1}$ ; ii) a banda localizada a  $974\text{ cm}^{-1}$  varia antes da  $1655\text{ cm}^{-1}$ ; iii) a banda localizada a  $974\text{ cm}^{-1}$  varia antes da localizada a  $1710\text{ cm}^{-1}$ ; iv) a  $1744\text{ cm}^{-1}$  varia antes da  $1643\text{ cm}^{-1}$  e, finalmente, v) a banda a  $1640\text{ cm}^{-1}$  varia antes da banda a  $1710\text{ cm}^{-1}$ . Estas correlações sugerem que, com o tratamento térmico, em primeiro lugar ocorrem alterações no amido e só depois ocorrem as alterações nas proteínas e/ou nos lípidos. Os triglicéridos parecem ser alterados antes das proteínas, e estas parecem ser alteradas antes dos ácidos gordos.

Relativamente aos mapas síncronos (Figura 11.5 C) e assíncronos (Figura 11.5 C) do sorgo, as variações das bandas correlacionadas são i) a banda  $987\text{ cm}^{-1}$  varia antes da banda a  $1639\text{ cm}^{-1}$ ; ii) a banda a  $987\text{ cm}^{-1}$  varia antes da banda a  $1658\text{ cm}^{-1}$ ; iii) a banda localizada a  $1640\text{ cm}^{-1}$  é alterada antes da banda a  $1019\text{ cm}^{-1}$  e iv) a banda a  $1519\text{ cm}^{-1}$  é alterada antes da  $1022\text{ cm}^{-1}$ . As alterações na cristalinidade do amido induzem alterações nas proteínas e depois o sistema torna-se amorfo.

A análise dos perfis apresentados juntamente com os mapas assíncronos revelou que a Banda I do amido, usada como sinal referência, não sofre alterações com o aumento da temperatura apenas para no caso do amido de milho (Figura 11.6 A). Quando a gelatinização ocorre em farinhas de milho e sorgo pode verificar-se que essa banda, considerada referência sofre alterações com a temperatura (Figura 11.6 B e 11.6 C). O mapa assíncrono da farinha de sorgo mostra uma correlação entre essa banda e a banda correspondente aos triglicéridos ( $1747\text{ cm}^{-1}$ ) (Figura 11.6 B e 11.6 C). Esta correlação confirma as evidências de complexação entre amido e lípidos.

Em todos os mapas, quer síncronos (à excepção do sorgo), quer assíncronos, uma correlação entre as regiões espectrais  $1800\text{-}1750\text{ cm}^{-1}$  e  $1200\text{-}900\text{ cm}^{-1}$ , sugere uma correlação entre lípidos oxidados e amido. Sabe-se que este constituinte da farinha é extremamente difícil de remover e a sua presença no amido de milho é possível.

## 11.4 Conclusões

Os resultados apresentados confirmam que, aquando da gelatinização da farinha de cereais, as alterações no amido não são as únicas transformações que o sistema sofre. Há ainda alterações a nível lípidico e a nível proteico.

A análise de correlação espectral em função da temperatura mostrou que, apesar de semelhanças entre milho e sorgo, estes cereais comportam-se de forma distinta quando submetidos ao efeito da temperatura, *i.e.* a correlação entre os constituintes da farinha é diferente. No milho a presença de lípidos no sistema e a sua correlação com outros constituintes da farinha é notada. No que diz respeito ao sorgo, a presença dos lípidos é pouco notada no sistema gelatinizado. O comportamento dos lípidos de sorgo confirma outros estudos efectuados através de RMN (SPE  $^{13}\text{C}$ ) mostrados no Capítulo 4. Nesse Capítulo demonstrou-se que, quando a farinha de sorgo é cozida em água os seus lípidos são imobilizados na matriz da farinha. Este comportamento bastante peculiar não é observado em amostras de milho cozidas e mostrou-se estar relacionado com as discrepâncias dos valores de digestibilidade proteica entre milho e sorgo (Capítulo 10).

## 11.5 Bibliografia

- Beleia, A., Miller, R. A. e Hosney, R. C. (1996). Starch Gelatinization Sugar Solutions. *Starch/starke*, **48**: 259 -262.
- Belton, P. S.; Goodfellow, B.J. e Wilson, R.H. (1991). Comparison of Fourier-Transform Mid Infrared Spectroscopy and Near Infrared Reflectance Spectroscopy with Differential Scanning and Calorimetry for the Study of the Staling of Bread. *Science Food Agric.*, **54**: 471-483.
- Galliard, T. e Bowler, P. (1987) Morphology and Composition of Starch in Starch: Properties and Potential (Ed. Galliard, T.) Society of Chemical Industry, John Wiley and Sons, 55-78.

- Goodfellow, B. J. e Wilson, R. H (1990) A Fourier Transform IR Study of the Gelation of Amylose and Amylopectin. *Biopolymers*, **30**: 1183-1189.
- Othmer, K. (1983) Starch *in* Encyclopedia of Chemical Technology, Volume 21, John Wiley & Sons, Canada.
- Noda, I. (1989) Two-Dimensional Infrared-spectroscopy, *Journal of the American Chemical Society*, **111**(21): 8116-8118.
- Noda I. (1990) 2-Dimensional infrared (2D IR) spectroscopy – Theory and Applications, *Applied Spectroscopy*, **44**(4), 550-561.
- Noda I.; Dowrey A.E. e Marcott C. (1993) Recent developments in 2-dimensional infrared (2D-IR) correlation spectroscopy, *Applied Spectroscopy*, **47**(9) 1317-1323.
- Noda I.; Dowrey, A.E.; Marcott C.; Story G.M. e Ozaki, Y., (2000) Generalized two-dimensional correlation spectroscopy, *Applied Spectroscopy*, **54**(7) 236A-248A.
- Lefèvre, T.; Arseneault K. e Pézolet, M. (2004) Study of protein aggregation using two-dimensional correlation infrared spectroscopy and spectral simulations, *Biopolymers*, **73**: 705-715.
- Lorenz, K. J e Kulp, K. (1991) Handbook of Cereal Science and Technology, MARCEL DEKKER, New York.
- Tester, R.F.; Karkalas, J. e Qi, X. (2004) Starch – composition, fine structure and architecture, *J. Cereal Sci.*, **39**, 151-164.
- Wilson, R. H. e Belton, P.S. (1988) A Fourier Transform infrared study of wheat starch gels. *Carbohydrate Research*, **180**: 339-344.
- Fawcett, A.H. (1996) Polymer Spectroscopy, John Wiley & Sons, 173-198.

### Conclusões finais

Através do estudo efectuado às cinco variedades de farinha utilizadas neste trabalho, verificou-se que os valores de digestibilidade proteica das amostras de sorgo e de milho, quando cruas, são semelhantes. Algumas variedades de sorgo chegam mesmo a apresentar valores de digestibilidade superiores aos do milho. Relativamente às amostras de sorgo, quando os valores de digestibilidade proteica são calculados após cozimento, observa-se o seu decaimento acentuado, comparativamente aos valores encontrados para amostras cruas.

Das variedades de cereais estudadas, as que apresentam inferior valor de digestibilidade quando cozidas em água são as K LW e KAT 369. Estas variedades não deverão ser submetidas a cozimento em água para posteriormente serem consumidas pela população. Alternativamente, deverão ser escolhidos outros tipos de processamento, como é o caso da maltagem ou da fermentação.

A diminuição dos valores da digestibilidade com o cozimento não está directamente correlacionada com os valores de digestibilidade das farinhas cruas. A digestibilidade proteica da farinha de milho permanece inalterada como o cozimento. A variedade K LW, farinha mais digerível quando crua, é a que sofre maior redução dos valores da digestibilidade quando cozida.

A digestão sequencial das amostras cruas de farinha revelou que o milho e o sorgo se comportam de forma similar. Quando a farinha cozida é submetida a digestão sequencial, começam a ser evidenciadas algumas diferenças. Nomeadamente, no tipo e quantidade de proteína que subsiste aos 120 minutos de digestão com pepsina. Quanto menos digerível é a farinha, maior é a quantidade de monómeros  $\gamma$  e  $\alpha$  e, principalmente, mais oligómeros de 45 kDa e 47 kDa são detectados no resíduo não digerido.

O controlo da presença destas quatro proteínas no resíduo, após digestão poderá ser útil para monitorizar a digestibilidade proteica das amostras.

O oligómero de 47 kDa, identificado pela primeira vez neste trabalho, está presente apenas nas amostras cozidas referentes às variedades com valores de digestibilidade inferiores, quando cozidas (KLW, KAT 369 e PAN 8569).

A caracterização espectroscópica das amostras de farinha antes e após o cozimento, confirmou que o cozimento induz alterações conformacionais a nível da proteína e do amido. Estas alterações são similares nos dois tipos de cereais estudados. No entanto, a mobilidade da fracção lipídica do sorgo é alterada drasticamente com o processo de cozimento, e de forma mais acentuada que no milho.

As alterações da mobilidade lipídica sugerem que, com o cozimento, os lípidos de sorgo são imobilizados pelas moléculas de proteína e/ou amido. Dada a natureza hidrofóbica das prolaminas de sorgo é provável a ocorrência de interacções entre lípidos e proteínas.

Estas observações foram confirmadas através do estudo da gelatinização de farinhas de milho e sorgo por 2D-COS. Esta análise de correlação espectral, mostrou que estes cereais se comportam de forma distinta quando submetidos ao efeito da temperatura, ou seja, a correlação entre os constituintes da farinha é diferente. No milho, observam-se correlações entre os lípidos e outros constituintes do sistema. No caso do sorgo, a presença dos lípidos não é notada no sistema gelatinizado.

Uma vez confrontados com estas evidências, estudou-se a digestibilidade proteica das farinhas às quais os lípidos tinham sido previamente retirados. Os valores de digestibilidade de sorgo cozido aumentam quando os lípidos são removidos da farinha antes desta ser cozida. Os lípidos parecem interagir com as proteínas e essas interacções podem ser, parcialmente, responsáveis pelo decaimento da actividade proteolítica nos estudos de digestibilidade *in vitro*. No que diz respeito ao milho, a ausência de lípidos no sistema contribui para uma redução dos valores de digestibilidade proteica, confirmando, desta forma, o papel dos lípidos na discriminação das farinhas dos dois cereais.

Foi ainda estudado o efeito na digestibilidade de um outro elemento exógeno às proteínas - os compostos fenólicos. A remoção de compostos fenólicos em variedades de sorgo sem taninos conduz à redução dos valores de digestibilidade proteica da farinha crua. A presença de compostos fenólicos nas amostras ajuda a solubilidade das proteínas, prevenindo a formação de interacções proteína-proteína.

Uma vez que as kafirinas têm vindo a ser identificadas como as principais envolvidas na redução digestibilidade proteica, foram pormenorizadamente caracterizadas. Através de técnicas electroforéticas, foram detectadas algumas diferenças entre kafirinas e zeínas. Comprovou-se que a hidrofobicidade das zeínas é inferior à das kafirinas, portanto não é de estranhar uma afinidade destas últimas pelos lípidos. Após análise qualitativa, utilizando um método de análise dos electroforegramas, verificou-se que as kafirinas apresentam na sua composição um oligómero a 66 kDa que não foi detectado nas zeínas. Por sua vez, as zeínas apresentam na sua composição um oligómero de 42 kDa que parece não estar presente na composição das kafirinas.

Por electroforese preparativa, foi estabelecida a composição dos oligómeros que fazem parte da fracção de prolaminas extraídas a partir de amostras de farinha crua e cozida. No que diz respeito ao oligómero de 66 kDa, nas variedades cuja digestibilidade proteica é mais afectada com o cozimento (KLW e KAT369), apresenta na sua composição monómeros  $\gamma$  e  $\alpha$ . Uma vez que as kafirinas  $\alpha$  são mais hidrofóbicas que as kafirina  $\gamma$ , os oligómeros das variedades KLW e KAT369 deverão ser mais hidrofóbicos. Nas restantes variedades, incluindo milho, esse oligómero é constituído, apenas, pelo monómero  $\gamma$ .

Verificou-se que, com o cozimento, tanto nas zeínas como nas kafirinas, com o cozimento parte dos oligómeros tornaram-se resistentes à acção de agentes redutores.

Através de FT-IR, detectou-se a presença de amido nos extractos de kafirinas e zeínas obtidos a partir de farinhas cozidas. Essa presença pode estar associada a possíveis interacções amido-proteína estabelecidas aquando do cozimento.

Como se pode verificar, a diminuição da digestibilidade das proteínas de sorgo, que ocorre quando a farinha é cozida em água, não é um processo simples nem depende exclusivamente de um factor. As alterações ocasionadas pelo cozimento não se fazem sentir apenas na fracção proteica, não dependendo pois, unicamente de factores endógenos da proteína. Existem factores exógenos às proteínas que parecem contribuir, fortemente, para a redução da digestibilidade proteica. São esses factores exógenos que marcam, primordialmente, a diferença de comportamento entre o milho (cereal cuja digestibilidade não é afectada com o cozimento) e o sorgo.

O cozimento da farinha de sorgo em água promove mobilização dos compostos fenólicos, retirando-os da proteína, aumentando a possibilidade de interacções hidrofóbicas proteína-proteína. Por outro lado, o aquecimento também permitirá pôr em contacto proteínas e ácidos gordos aumentando a hidrofobicidade proteica.

Considerando a estrutura organizativa do corpo proteico, é muito provável que grande parte destas interacções: proteína-amido e proteína-lípido, se processem à sua superfície. As ligações S-S, estabelecidas aquando do cozimento, entre as kafirinas  $\gamma$  e  $\beta$  da superfície do corpo proteico, e entre estas e as glutelinas da matriz proteica contribuem para um maior efeito de inter cruzamentos à superfície do corpo proteico. Desta forma, formar-se-ia uma barreira protectora do corpo proteico dificultando a actividade proteolítica das enzimas digestivas.

Por outro lado, o desaparecimento aparente dos lípidos do sistema de sorgo cozido, que se verifica pelo 2D-COS, poderá sugerir a formação de complexos de inclusão com o amido.

Os resultados deste trabalho permitem concluir que a digestibilidade proteica está relacionada com três factores principais: ausência/presença de compostos fenólicos, interacção com lípidos e amido.